

Selektion und Identifikation von Peptid Nukleinsäuren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mark Matzas
aus Kiel

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2002 bis September 2005 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst an der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C. Betzel

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> ; Kapillarelektrophorese
CGE	<i>Capillary gel electrophoresis</i> ; Kapillar-Gelelektrophorese
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline Phosphatase</i>
CMC	<i>critical micelle concentration</i> ; Kritische Mizellare Konzentration
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid hydrochlorid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EOF	<i>electroosmotic flow</i> ; Elektroosmotischer Fluss
GC	<i>Gas Chromatography</i>
h	<i>hour</i> ; Stunde
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N</i> '-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ID	Innendurchmesser
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
keV	Kiloelektronenvolt
kV	Kilovolt
LB	Lurea-Bertani
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LNA	<i>locked nucleic acids</i>
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MES	<i>N</i> -Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat reduziert
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilo-Triacetat
OD	Optische Dichte

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PPPS	<i>precision plus protein standard</i>
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i> ; einzelsträngige DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
V	Volt
xg	Mehrfaches der Erdbeschleunigung

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Kombinatorische Bibliotheken für die Selektion neuer Liganden	5
1.1.1	Chemisch-kombinatorische Bibliotheken	7
1.1.2	<i>Phage-Display</i>	9
1.1.3	Ribosomen-Display	9
1.2	Aptamere	10
1.2.1	SELEX	11
1.2.2	CE-SELEX	12
1.2.3	DNA-SELEX ohne eingeschobene Amplifikationsschritte	13
1.3	Nukleinsäure-analoge Verbindungen	14
1.3.1	Peptid-Nukleinsäuren (PNA)	17
1.3.2	Chemische und biologische Eigenschaften von PNA	19
1.3.3	Synthese von PNA	20
1.3.4	Die räumliche Struktur von PNA	21
1.4	Kapillarelektrophorese	22
1.5	Aufgabenstellung	26
2	Material	27
3	Methoden	41
3.1	Molekularbiologische Methoden	41
3.2	Proteinbiochemische Methoden	51
3.3	Trennungs- und Analysemethoden	55
4	Ergebnisse	63
4.1	Selektion von PNA-Molekülen	63
4.1.1	Expression des Zielmoleküls	63
4.1.1.1	Expression und Reinigung thermostabiler Dihydrofolatreduktase	64
4.1.1.2	Klonierung und Expression humaner DHFR	64
4.1.2	Immobilisierung thermostabiler DHFR	66
4.1.3	Trennung von PNA und DHFR in Lösung	68
4.1.3.1	Trennung von PNA und DHFR mittels HPLC	68

4.1.3.2	Trennung von PNA und DHFR mittels Kapillarelektrophorese	69
4.2	Identifizierung von PNA	74
4.2.1	Identifizierung von PNA durch Hybridisierung an DNA-Bibliotheken	74
4.2.1.1	Optimierung der Amplifikation	75
4.2.1.2	Hybridisierung der PNA	76
4.2.1.3	Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden durch Immobilisierung	76
4.2.1.4	Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden mittels HPLC	81
4.2.1.5	Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden mittels Kapillarelektrophorese	82
4.2.2	Enzymatischer Abbau von ssDNA	86
4.2.2.1	Spezifischer Abbau nicht hybridisierter DNA durch Endonukleasen	86
4.2.2.2	Spezifischer Abbau nicht hybridisierter DNA durch Restriktionsendonukleasen	97
4.2.3	Identifizierung von PNA durch Synthese komplementärer DNA	105
4.2.3.1	Chemische Ligation mit EDC	106
4.2.3.2	Chemische Ligation mit Cyanogenbromid	107
4.2.3.3	Ligation mit doppelstrang-spezifischen Ligasen	112
4.2.3.4	Ligation mit T4 RNA Ligase	113
5	Diskussion	135
6	Ausblick	161
7	Zusammenfassung	165
8	Summary	167
	Anhang	189

1 Einleitung

Nahezu alle zellulären Funktionen basieren auf spezifischen Interaktionen biologischer Makromoleküle. Ein Verständnis für diese Interaktionen in biologischen Prozessen und deren Kontrollmechanismen ist daher eine Voraussetzung für den effizienten Eingriff in diese Abläufe, um beispielsweise krankheitsrelevante Störungen zu diagnostizieren und entsprechende Wirkstoffe zu generieren. Sowohl für die analytische und diagnostische als auch für die therapeutische Anwendung ist daher die Verfügbarkeit von spezifischen Liganden mit hoher Affinität, die lediglich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen ihre Zielmoleküle binden, unverzichtbar. Die Entwicklung und die Produktion dieser Liganden stellt daher einen wichtigen Teil der heutigen biochemischen Forschung dar.

Antikörper sind die bekanntesten Liganden, die ursprünglich durch Immunisierung von Tieren hergestellt wurden. Mittlerweile sind *in vitro*-Methoden für die Herstellung von Antikörpern und anderen Liganden verfügbar, die biologische und artifizielle Moleküle umfassen. Im Folgenden werden verschiedene Herstellungsverfahren für Liganden und verwendete Komponenten erläutert.

1.1 Kombinatorische Bibliotheken für die Selektion neuer Liganden

Sowohl für den Begriff „Ligand“ als auch für den Begriff „Zielmolekül“ existiert keine Definition hinsichtlich der Beschaffenheit oder der Größe. Antikörper mit einer molaren Masse von 150 kDa können als Liganden fungieren und niedermolekulare Zielmoleküle ebenso binden, wie ganze Proteine. Sie können aber auch selbst als Zielmolekül dienen und wiederum von Antikörpern oder anderen Molekülen spezifisch und mit hoher Affinität gebunden werden. Bei einer nicht-kovalenten Ligand-Zielmolekül-Wechselwirkung beträgt die molare Masse zumindest bei einem der involvierten Moleküle im Allgemeinen mehr als 1 kDa. Als Ligand wird dabei meist das generierte Molekül bezeichnet, das in der Lage ist, das gegebene Zielmolekül zu binden. Es kann sich bei den Liganden um Peptide, Proteine oder Oligonukleotide, aber auch um Derivate dieser oder um artifizielle Komponenten handeln. Die Größe der Zielmoleküle ist dabei nicht beschränkt und kann einige hundert Gramm pro mol bis hunderte kilo-Dalton betragen.

Auch niedermolekulare Substanzen werden teilweise ebenfalls als Liganden bezeichnet. Hierbei handelt es sich im Allgemeinen bei dem Zielmolekül um

Einleitung

eine Verbindung mit einer wesentlich höheren molaren Masse. Ein Beispiel für diese Umkehr der Größenverhältnisse von Ligand und Zielmolekül sind Biotin und Streptavidin oder niedermolekulare Enzyminhibitoren, die sich in die Topographie eines Proteins durch nicht-kovalente Wechselwirkung einlagern können.

Im Allgemeinen werden zwei grundlegend verschiedene Verfahren zur Herstellung von Liganden unterschieden. Das so genannte rationale Design wird *in silico* unter Zuhilfenahme von Computern durchgeführt. Hierbei besteht das Ziel in der Vorhersage der Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen aufgrund einer dreidimensionalen Struktur. Diese kann bei Proteinen oder Nukleinsäuren beispielsweise durch Strukturuntersuchungen ermittelt, oder aufgrund bekannter Strukturbeziehungen errechnet worden sein, indem ein Zusammenhang zwischen der Sequenz und der spezifischen Faltung des Proteins bzw. der Nukleinsäure vorhergesagt wird. Anhand dieser Daten und bekannter nicht-kovalenter Wechselwirkungen wird ein entsprechender Ligand geformt. Dem Modellieren des Liganden folgt üblicherweise dessen Herstellung für die Verifizierung der vorhergesagten Wechselwirkungen.

Diese Technik jedoch ist durch mehrere Faktoren limitiert. Zum einen sind Informationen zu Struktur-Funktions-Beziehungen der meisten Moleküle unzureichend, zum anderen ist die Deckung der *in vitro*-Ergebnisse mit den Computervorhersagen aufgrund der Komplexität der involvierten Parameter gering. Als ein Grund hierfür kann das Phänomen des „*induced fit*“ angeführt werden, unter dem eine Änderung der Molekülstrukturen bei der Interaktion verstanden wird [1–2]. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der enormen Anzahl möglicher Liganden, die für die Evaluierung einer gegebenen Funktion hergestellt werden müssten [3].

Andere Verfahren hingegen beruhen auf der empirischen Selektion potentieller Bindungspartner aus umfangreichen Bibliotheken, die meist kombinatorisch chemischen Ursprungs sind. Diese Bibliotheken können entweder aus natürlichen Molekülen, wie Peptiden, Proteinen oder Nukleinsäuren oder aus artifiziellen Molekülen bestehen. Mit voranschreitender Automatisierung traditioneller Synthesetechniken konnten immer umfangreichere Molekül-Bibliotheken bereitgestellt werden. Die Konsequenz hieraus war eine schnelle Entwicklung auf dem Gebiet der kombinatorischen Chemie [4].

Der Erfolg der Selektion beruht hier unter anderem auf der Diversität der Bibliothek, d.h. der Anzahl verschiedener Moleküle in ihr. Je größer die Diversität ist, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufriedenstellender Bindungspartner für ein Zielmolekül enthalten ist. Die Identifizierung der Varianten nach dem Selektionsprozess stellt hierbei das zentrale Problem dar, da für die Identifizierung eine ausreichende Stoffmenge benötigt wird. Um

dies zu gewährleisten, muss eine Bibliothek mit einer entsprechend hohen Kopienzahl jedes Moleküls für die Selektion eingesetzt werden. Die handhabbare Stoffmenge ist jedoch beschränkt, daher ist die für die Identifizierung notwendige Stoffmenge ein limitierender Faktor für die Diversität der Bibliothek, denn diese verhält sich stets antiproportional zur Anzahl der Kopien einzelner Spezies in der Bibliothek.

Die Natur nutzt eine Abfolge von Mutation und Selektion um hoch angepasste Individuen hervorzubringen [5–7]. Es ist mittlerweile möglich, diese natürlichen evolutionären Prozesse technologisch nachzuempfinden. Replizierbare Systeme, wie Viren, Zellen oder Nukleinsäuren bieten den Vorteil der Kopplung von Phenotyp und Genotyp und ermöglichen theoretisch die Amplifikation und Identifikation eines einzelnen Interaktionspartners [8–9]. Die Diversität solcher Pools ist daher lediglich durch die Anzahl der handhabbaren Menge bei der Selektion limitiert und übersteigt daher die von Bibliotheken aus nicht replizierbaren Komponenten.

Für die Suche nach bindenden Molekülen werden mittlerweile kombinatorische Bibliotheken verwendet, die eine Vielfalt von bis zu 10^{16} Varianten aufweisen [10]. Diese werden mit Hilfe von evolutionären *in vitro*-Verfahren durchsucht. Durch sich wiederholende Runden aus Selektion und Amplifikation wurden Moleküle gefunden, die ihr Zielmolekül mit höherer Affinität binden als ihre natürlichen Gegenstücke. Die Erweiterung der *in vitro*-Verfahren durch mutagene Komponenten erhöht die Anzahl potentieller Liganden zusätzlich. Verschiedene Verfahren wie mutagene PCR oder direkte Mutagenese kommen hier zum Einsatz [11–13]. Auch die Verwendung von rekombinierenden Techniken wie *chain shuffling* oder *DNA shuffling* nähern die Verfahren weiter an den natürlichen evolutionären Prozess an und erzeugen zusätzliche Diversität [14–17].

Gegenwärtig sind verschiedene Arten von kombinatorischen Bibliotheken in Benutzung, die aus synthetischen oder biologischen Molekülen bestehen.

1.1.1 Chemisch-kombinatorische Bibliotheken

Die Herstellung von Molekül-Bibliotheken erfolgt durch die simultane Synthese einer großen Anzahl von Verbindungen. Grundlage dabei ist meist die kovalente Verknüpfung eines Satzes chemischer Bausteine untereinander, in verschiedenen Kombinationen. Hierbei wird zwischen zwei verschiedenen Bibliotheks-Typen unterschieden, die sich grundlegend im Syntheseverfahren unterscheiden. In der parallelen Synthese werden die Bibliothekskomponenten in separaten Ansätzen hergestellt, getestet und mit klassischer Analytik charakterisiert. Die *split-pool*-Synthese hingegen besteht aus einer

sukzessiven Aufteilung, Derivatisierung und Vereinigung von Reaktionsansätzen, wobei Mischungen aus verschiedenen Molekülen erhalten werden [18]. Da sich diese künstlich generierten Moleküle nicht replizieren lassen, wurde für deren Isolierung und Identifizierung eine Vielzahl von Strategien erarbeitet, wie z.B. die Synthese der Komponenten auf markierten Mikro-Partikeln [19]. Diese kombinatorischen Bibliotheken können aus Polymeren natürlicher Bausteine, wie Aminosäuren, Nukleotiden oder aus Derivaten dieser bestehen, die größtenteils mittels automatisierter Synthese-Verfahren vorwiegend an festen Phasen, aber auch in Lösung hergestellt werden können. Neben polymeren Verbindungen nimmt auch die Bedeutung von Bibliotheken aus kleinen organischen Molekülen artifizieller Natur stetig zu [20–21]. Aufgrund der benötigten Menge für die Identifizierung der selektierten Komponenten liegen die Diversitäten solcher Bibliotheken, bei denen keine Vervielfältigung der Moleküle möglich ist maximal bei einigen hunderttausend Molekülen. Neben der Isolierung der gewünschten Verbindungen besteht eine weitere Problematik bei kombinatorischen Ansätzen in der Qualitätskontrolle der Bibliothek, d.h. in der Verifizierung der Diversität, da diese beispielsweise aufgrund unzureichender Reaktions-Ausbeuten während der Herstellung nicht immer gewährleistet ist [22].

Die Mimotop-Strategie

Die Diversität einer Bibliothek lässt sich theoretisch bestimmen. Bei einer Polymerisation von Bausteinen errechnet sie sich aus der Anzahl der verschiedenen Bausteine potenziert mit der Länge der Kette. Beispielsweise besitzt eine octamere Peptidbibliothek aus 20 verwendeten Aminosäuren bereits eine Diversität von $20^8 = 2.56 \times 10^{10}$ verschiedenen Peptiden. Diese Anzahl von Komponenten lässt sich nicht mehr mittels klassischer Verfahren durchsuchen, bei denen die gewünschten Komponenten isoliert und charakterisiert werden. Daher müssen hier zusätzlich evolutionäre Komponenten in die Selektion eingebunden werden.

Ein Beispiel für einen kombinatorischen Ansatz, der auf einer parallelen Synthese beruht und gleichermaßen eine evolutionäre Entwicklung beinhaltet, ist die Herstellung von Liganden, die an monoklonalen Antikörpern binden, welche diskontinuierliche Epitope erkennen. Diese Technik ist auch unter dem Namen „Mimotop-Strategie“ bekannt [23]. Hierbei wurden octamere Peptide des Formats $XXXO_1O_2XXX$ synthetisiert. Die Positionen O_1 und O_2 stellen definierte Aminosäuren dar, während die X-Positionen randomisiert sind. Um sicherzustellen, dass alle möglichen Kombinationen von O_1 und O_2 vorhanden waren, wurden 400 Sätze von Peptiden synthetisiert. Durch ELISA wurden die Peptide auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht und jenes

mit den besten Bindungseigenschaften diene als Grundlage für die Synthese von Peptidsätzen der Form $XXO_3D_1D_2O_4XX$, wobei D_1 und D_2 die bereits festgelegten Aminosäuren darstellten, die nun konstant gehalten wurden. Dieser Zyklus von Synthese und Selektion wurde solange wiederholt, bis für alle Positionen die Aminosäuren optimiert waren.

Obwohl die Verwendung von kombinatorischen Bibliotheken dieser Art erfolgreich bei der Untersuchung von Epitopen eingesetzt wurde, so ist ihre Diversität auf etwa 10^{10} unterschiedliche Moleküle beschränkt. Nachteilig ist weiterhin, dass die Selektion von Liganden aus diesen Bibliotheken mit einem enormen Syntheseaufwand verbunden ist. Diese Einschränkungen machen die Selektion von Liganden unter Verwendung dieser Technik zeitintensiv und kostenaufwendig.

1.1.2 Phage-Display

Eines der etabliertesten Selektionsverfahren ist die *Phage-Display*-Technik [24]. Sie basiert auf der Nutzung des M13-Phagen, der in der Lage ist, einen *E. coli* F^+ Stamm zu infizieren. Diese Technik besteht aus einem zyklischen Prozess von Expression, Selektion hinsichtlich der Bindungseigenschaften und Amplifikation. Auf der Oberfläche des Bakteriophagen können Peptide oder Proteine als Interaktionspartner für das Zielmolekül in Form eines Fusionskonstruktes mit dem Hüllprotein des GenIII exprimiert werden. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber chemischen kombinatorischen Bibliotheken ist die direkte Kopplung von Phenotyp und Genotyp, d.h. jedes Element der Bibliothek trägt seinen „Bauplan“ mit sich und kann repliziert werden. Dies ermöglicht die Identifizierung eines einzelnen Bindungspartners durch eine Amplifikation der selektierten Phagen mittels einer Infektion von *E. coli* und der Analyse des kodierenden Genoms. In einem Volumen von 1 ml können bis zu 10^{14} Phagen enthalten sein. Die Größe der Bibliothek wird allerdings durch die Transformationseffizienz eingeschränkt, daher liegt die maximale Diversität bei bis zu 10^{11} Varianten [25].

1.1.3 Ribosomen-Display

Die Grundlage für das Ribosomen-Display besteht in einem *in vitro*-Translationssystem, bei dem ein Poly-Ribosom-Komplex, der das translatierte Peptid trägt, an der kodierenden mRNA gebunden bleibt [26]. Die kodierende RNA der bindenden Varianten kann so wiedergewonnen und die genetische Information amplifiziert und analysiert werden. Alternativ kann die entsprechende cDNA erneut transkribiert und translatiert werden, um so eine mit

bindenden Molekülen angereicherte Bibliothek zur erneuten Selektion herzustellen. Die cDNA der nach mehreren Selektionsrunden angereicherten Varianten kann dann in ein Plasmid kloniert werden, das sowohl zur DNA-Sequenzierung als auch zur Expression der Varianten genutzt werden kann, um die Bindungseigenschaften individueller Klone z.B. in einem ELISA zu untersuchen. Auch beim Ribosomen-Display können aufgrund der Replizierbarkeit der Komponenten wesentlich höhere Diversitäten erreicht werden, als bei artifiziellen Molekül-Bibliotheken. Aufgrund eines geringeren Anspruches bezüglich des Replikations-Systems, übersteigen die Diversitäten jedoch ebenfalls die, des *Phage-Display*-Verfahrens. Mattheakis *et al.* konstruierten eine DNA-Bibliothek mit einer Diversität von 10^{12} Deka-Peptiden, die mittels eines *E. coli* S30 *in vitro* Transkriptions-Translationssystem exprimiert wurden [27]. Ein dem Ribosomen-Display ähnliches Verfahren basiert auf einer kovalenten Bindung zwischen dem Peptid und der kodierenden mRNA. Beim mRNA-Display wird dies durch Puromycin, einem Peptid-Akzeptor-Antibiotikum erreicht, das am 3'-Ende der mRNA über einen ssDNA-Linker angefügt wird [28–29].

1.2 Aptamere

Nukleinsäuren können auch selbst als bindendes Molekül fungieren. Einzelsträngige Nukleinsäuren können eine dreidimensionale Struktur annehmen, die von ihrer Sequenz bestimmt wird. Diese Strukturen basieren vorwiegend auf intramolekularen Wechselwirkungen der Nukleobasen und sind durch die Ausbildung von Helices, Tripel-Helices, Haarnadel-Schleifen, Pseudoknoten und G-Quartetten sehr vielseitig [30–33]. Sie geben darüber hinaus Nukleinsäuren die Fähigkeit, Oberflächenstrukturen von Zielmolekülen zu erkennen und fest an sie zu binden. Die einfache Replikation der Bibliothekskomponenten, die lediglich aus der Vervielfältigung der Nukleinsäure selbst besteht, erlaubt die Herstellung von Bibliotheken mit den höchsten bekannten Diversitäten, die bis zu 10^{16} verschiedene Moleküle beinhalten können.

Diese spezifisch ligandenbindenden Nukleinsäuren werden Aptamere (lat. *aptus* = passen) genannt. Diese können aus RNA oder ssDNA bestehen [34–36]. Die möglichen Ziele erstrecken sich von kleinen organischen Molekülen wie z.B. Koffein oder der verwandten Verbindung Theopyllin [37] über biologischen Kofaktoren [38], Aminosäuren [39–40], Hormone [41], Peptide [13,42] Polysaccharide [43] und Proteine [44], bis hin zu Viren [45–46] oder Zellen. Aptamere mit einer Spezifität für Übergangszustandsanaloge chemischer Reaktionen können zudem katalytische Eigenschaften aufweisen [47].

Die Dissoziationskonstanten der affinsten Aptamere reichen dabei bis in den subnanomolaren Bereich [38,48]. Aptamere können darüberhinaus Spezifitäten aufweisen, die sie in die Lage versetzen, zwischen Enantiomeren zu unterscheiden [49], oder die An- bzw. Abwesenheit von funktionellen Gruppen wie Methyl- oder Hydroxygruppen zu erkennen [37,50]. Dies erlaubt den Einsatz in therapeutischen oder diagnostischen Applikationen [51–55]. Im Gegensatz zu Antikörpern umgehen Aptamere weiterhin das Problem der Immunogenität [56], was für den therapeutischen Einsatz vorteilhaft ist. Dem Problem einer schnellen Entfernung der Aptamere aus der Blutzirkulation kann dabei durch Verknüpfung an große Moleküle wie z.B. PEG entgegengewirkt werden [57–58].

1.2.1 SELEX

Aptamere werden mittels SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) aus einer kombinatorischen Molekül-Bibliothek isoliert. Verglichen mit chemisch kombinatorischen Ansätzen oder Bibliotheken, die beim *Phage-Display* oder beim Ribosomen-Display verwendet werden, stellen SELEX-Bibliotheken eine enorme Diversität zur Verfügung, die bis zu 10^{16} Varianten betragen kann [10]. Diese Limitierung ergibt sich lediglich aus der handhabbaren Stoffmenge während des Experimentes. Eine Oligonukleotidbibliothek mit einem randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden besitzt eine Diversität von $4^{40} = 1,21 \times 10^{24}$. Wäre jede Variante einmal vorhanden, entspräche dies einer Stoffmenge von ca. 2 mol. Eine entsprechende ssDNA Bibliothek mit einer konstanten Region von je 20 Nukleotiden am 3'- und am 5'-Ende des randomisierten Bereiches hätte somit eine Länge von 80 Nukleotiden und damit eine Molare Masse von ca. 26.400 g/mol. Eine Bibliothek, in der jede mögliche Variation einmal enthalten wäre, würde demnach ca. 53 kg wiegen.

Das RNA-SELEX-Verfahren

Beim SELEX-Verfahren zur Selektion von RNA-Aptameren dient eine synthetische ssDNA Bibliothek als Ausgangsmaterial (Abbildung 1.1). Diese enthält eine randomisierte Region von ca. 20 bis 40 Nukleotiden, sowie zwei flankierende Regionen am 3'- und am 5'-Ende, die zur Amplifikation benötigt werden (Primerregionen). Die Bibliothek wird zunächst mittels PCR amplifiziert, wobei durch einen Primerüberhang ein Promotor für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase eingefügt wird. Nach einer Transkription liegt die RNA-Bibliothek vor, die bezüglich der gewünschten Eigenschaften durchsucht wird, indem sie in Kontakt mit dem Zielmolekül gebracht und die nicht bindende

RNA von den RNA/Zielmolekül-Komplexen getrennt wird. Nach der Elution der bindenden RNA vom Zielmolekül wird diese einer reversen Transkription unterzogen und die erhaltene DNA mittels PCR amplifiziert. Diese dient wiederum als Vorlage für eine Transkription zur Herstellung einer mit bindenden RNA-Varianten angereicherten Bibliothek, die in einer neuen Selektionsrunde verwendet werden kann. Alternativ kann die amplifizierte cDNA kloniert und sequenziert werden, um einzelne Binder zu charakterisieren.

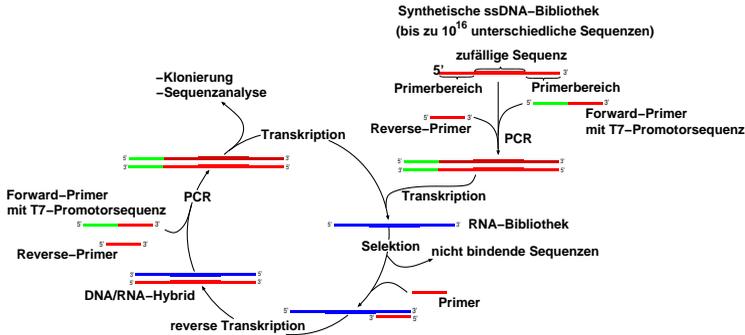


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des RNA-SELEX-Verfahrens.

Das DNA-SELEX-Verfahren

Der Selektion von DNA-Aptameren liegt wiederum eine Bibliothek aus ssDNA zugrunde, die direkt in der ersten Selektionsrunde eingesetzt werden kann (Abbildung 1.2). Nach der Elution vom Zielmolekül werden die wiedergewonnenen Moleküle durch eine PCR amplifiziert, wobei der Primer für den Matrizenstrang mit einem Affinitätsmarker (z.B. Biotin) versehen wird, um ihn hinterher vom Aptamerstrang zu trennen. Nach jeder Selektionsrunde werden die bindenden DNA Moleküle angereichert und nach hinreichender Selektion kloniert und sequenziert.

1.2.2 CE-SELEX

Bei der Selektion von Aptameren mittels des SELEX-Verfahrens stellt die erfolgreiche Trennung der Aptamer/Zielmolekül-Komplexe von den nicht bindenden Aptameren eine wichtige Voraussetzung für die Anreicherung bindender Kandidaten aus der Bibliothek dar. Je besser diese Trennung durchgeführt wird, desto schneller werden bindende Varianten angereichert. Die übliche Vorgehensweise besteht darin, das Zielmolekül an einem festen Träger zu immobilisieren, mit der Aptamerbibliothek zu inkubieren und die

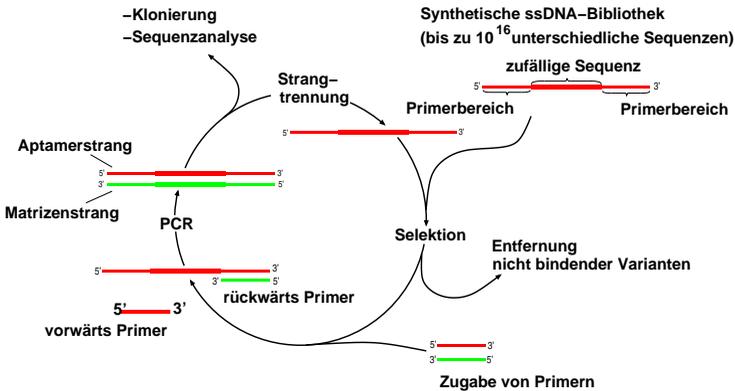


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des DNA-SELEX-Verfahrens.

nicht bindenden Nukleinsäuren durch Waschen zu entfernen. Nachteile dieser Technik liegen in der verminderten Diffusion der Zielmoleküle und in der sowohl spezifischen, als auch unspezifischen Bindung der Nukleinsäuren an das Trägermaterial. Eine Alternative zur Immobilisierung ist eine chromatografische oder elektrophoretische Trennung der Aptamer/Zielmolekül-Komplexe von nicht bindenden Varianten. Von Mendonsa *et al.* wurde eine Selektion von DNA-Aptameren gegen humanes IgE durchgeführt. Die Aptamer/Zielmolekül-Komplexe wurden dabei kapillarelektrophoretisch abgetrennt. Durch die Effizienz dieser Trennung gelang eine Anreicherung von bindenden Molekülen von etwa 60 % bereits nach der ersten Selektionsrunde [59–60].

1.2.3 DNA-SELEX ohne eingeschobene Amplifikationsschritte

Smith und Anslyn entwickelten eine Methode zur Selektion von DNA-Aptameren ohne eingeschobene Amplifikationsschritte [61–62]. Bei dieser Methode wurden nach dem ersten Selektionsschritt die bindenden Kandidaten nicht amplifiziert, sondern unmittelbar nach Abtrennung der Elution der nächsten Selektionsrunde zugeführt. Die bindenden Moleküle werden hierbei nicht angereichert, vielmehr wird eine Entfernung bzw. Abreicherung der nicht-bindenden Varianten durchgeführt. Diese *in vitro* Selektionsmethode geht von einer Bibliothek geringerer Diversität aus, die jedoch eine Vielzahl von Kopien pro Spezies enthält. Bei einem randomisierten Bereich von 18 Nucleotiden beträgt die Diversität $4^{18} = 6,87 \times 10^{10}$ Varianten, womit eine Startbibliothek mit einer Stoffmenge von 11,4 nmol statistisch 10^5 Kopien pro Spezies enthält.

Damit bleiben auch nach mehreren Selektionszyklen und den dabei auftretenden Verlusten genug Kopien der Binder übrig, um sie mittels PCR nach der letzten Runde zu vervielfältigen und zu charakterisieren.

Nachteilig hierbei ist die geringere Diversität der Bibliothek. Mit ca. 10^{11} Varianten liegt sie zwar über dem humanen Immun-Repertoire, jedoch ist sie im Vergleich zu konventionellen SELEX-Bibliotheken um ein Vielfaches kleiner. Aufgrund postulierter Zusammenhänge zwischen Diversität einer Bibliothek und der Affinität selektierter Binder kann sich dies negativ auf die Affinität der Liganden auswirken. Während herkömmliche Selektionen mittels RNA-SELEX jedoch etwa zwei Tage pro Selektionsrunde in Anspruch nehmen, wobei meistens sieben oder mehr Runden durchgeführt werden, nahm das Experiment von Smith und Anslyn zwei Tage bei sechs Selektionsrunden in Anspruch. Der Vorteil dieser Methode besteht daher in der Zeitersparnis durch ein wesentlich beschleunigtes Selektionsverfahren.

1.3 Nukleinsäure-analoge Verbindungen

Oligonukleotide werden unter anderem als Sonden in der Nukleinsäure-Diagnostik oder als Gegenstrang-Reagenz (*antisense agent*) zur Expressionsregulierung eingesetzt. Das grundlegende Prinzip besteht dabei stets in der Hybridisierung der Nukleinsäure mit einem komplementären Gegenstück. Der Erfolg hängt dabei entscheidend von der Genauigkeit der molekularen Erkennung während des Hybridisierungsprozesses ab. Um die Hybridisierungseigenschaften oder die Stabilität von Oligonukleotid-Sonden zu verbessern, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Oligonukleotid-Derivaten synthetisiert, die sich von natürlichen Nukleinsäuren durch das Anfügen oder Austauschen einer oder mehrerer funktioneller Gruppen unterscheiden, oder eine grundlegend andere Struktur als DNA oder RNA besitzen. Neben der Affinität bzw. der thermodynamischen Stabilität des Hybrides aus Nukleinsäure und Nukleinsäure-Analogen spielt dabei auch das Diskriminierungsvermögen von Basenfehlpaarungen, sowie die chemische und biologische Stabilität der Nukleinsäure-Analoga eine entscheidende Rolle.

Derivatisierung natürlicher Nukleinsäuren

Bei der Verwendung im Rahmen einer Therapie oder als diagnostisches Werkzeug in biologischen Flüssigkeiten sind Nukleinsäuren, insbesondere RNA, stets mit dem Nachteil der Degradierbarkeit durch Nukleasen behaftet. Die Halbwertszeit von RNA im humanen Blutserum beträgt ca. 8 min [63]. Es existieren daher zahlreiche Ansätze zur Stabilisierung von Nukleinsäuren durch chemische Modifikation. Diese bestehen unter anderem in der Derivatisierung

des Rückgrates [64] (Abbildung 1.3; A–D). Ein Beispiel für eine solche Derivatisierung sind Phosphorothioate [65–67]. Diese werden sowohl in *antisense*-Anwendungen [68] als auch im SELEX-Verfahren eingesetzt [69]. Weitere Modifikationen bestehen im Austausch der Phosphat-Gruppe durch eine ungeladene Methylphosphonat- oder Dimethylsulfongruppe [70], wobei diese Derivate aufgrund der fehlenden Ladung Eigenschaften aufweisen, die sich signifikant von denen, natürlicher Nukleinsäuren unterscheiden [71–72] und nur noch eingeschränkt in enzymatischen Reaktionen verwendet werden können. Andere Modifikationen zur Stabilisierung von RNA bestehen in der Derivatisierung der Ribose am 2'-Kohlenstoffatom (Abbildung 1.3; E), wobei die Hydroxygruppe durch Amino- oder Azidogruppen [73], durch ein Fluoratom [74] oder durch eine O-Methylgruppe ausgetauscht wird [51]. Mit Aminogruppen oder Fluoratomen modifizierte Nukleotide werden von Polymerasen als Substrat akzeptiert und können in einer Aptamer-Selektion eingesetzt werden [63,75]. Aufgrund der Pyrimidin-Spezifität der meisten RNasen, reicht es dabei im Allgemeinen aus, die Modifikation auf die 2'-OH-Gruppe von Pyrimidinen zu beschränken [76].

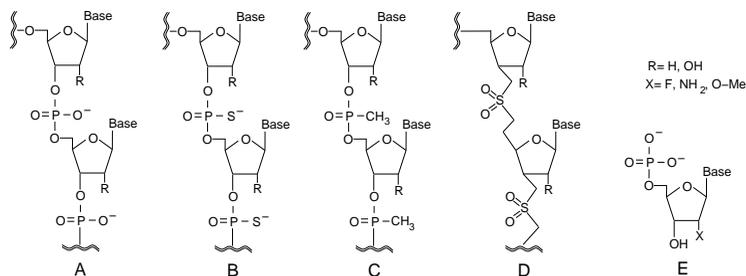


Abbildung 1.3 Derivatisierung von Nukleinsäuren zur Stabilisierung oder Eliminierung der elektrischen Ladung. **(A)** Native Nukleinsäure mit Phosphodiesterückgrat; **(B)** Phosphorothioat; **(C)** elektrisch neutrales Methylphosphonat-Derivat; **(D)** elektrisch neutrales Dimethylsulfon-Derivat; **(E)** Derivatisierung am 2'-Kohlenstoffatom der Ribose.

LNA (*locked nucleic acids*)

Bei den *locked nucleic acids* handelt es sich um ein Nukleinsäure-Derivat, bei dem das 2'-Sauerstoffatom der Ribose mit dem 4'-Kohlenstoffatom durch eine Methylengruppe verbunden ist (Abbildung 1.4) [77–80]. Diese Änderung führt zu einer höheren thermischen Stabilität von LNA/DNA- oder LNA/RNA-Hybriden, die ebenfalls mit einer erhöhten Stringenz einhergeht. Der Einsatz

Einleitung

von LNA erstreckt sich über DNA Mikroarrays, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und *antisense*-Experimente. Weiterhin weisen LNA oder LNA/DNA-Chimere eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen auf [81].

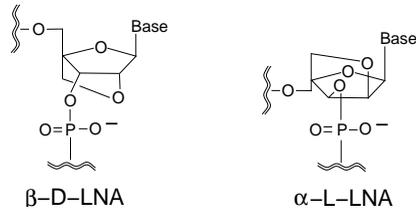


Abbildung 1.4 *Locked nucleic acids* sind eine bicyklische Nukleinsäure-analoge Verbindung, in der das 2'-Sauerstoffatom der Ribose mit dem 4'-Kohlenstoffatom durch eine Methylengruppe verbunden ist. LNA-Hybride mit DNA oder RNA besitzen eine höhere thermische Stabilität und eine bessere Diskriminierung von Fehlpaarungen. Es existieren unterschiedliche Stereoisomere von LNA (α -L-ribo- und β -D-ribo-Konfiguration)

L-Nukleinsäuren (Spiegelmer)

Eine grundlegende Veränderung zur Erhöhung der Stabilität *in vivo* besteht in der Synthese von Nukleotiden auf der Basis von L-Ribose und der Herstellung von Oligomeren mit einer veränderten Stereochemie. Aufgrund der hohen Substratspezifität von Nukleasen werden diese „Spiegelmer“ nicht als Substrate erkannt und weisen eine gesteigerte Halbwertszeit in biologischen Flüssigkeiten auf [82–84]. Die Substrat-Inkompatibilität beschränkt sich jedoch nicht auf Nukleasen, sondern schließt auch Polymerasen mit ein, wodurch ein direkter Einsatz der L-Nukleinsäuren im SELEX-Verfahren nicht möglich ist. Daher werden Aptamere aus D-RNA mit Spezifität für ein stereochemisch invertiertes Zielmolekül selektiert, anhand deren Sequenz die „Spiegelmer“ chemisch synthetisiert werden. Dies setzt allerdings die Synthese von entsprechenden gespiegelten Zielmolekülen voraus, was bei größeren Molekülen problematisch ist [42].

Austausch des Rückgrates

Tiefgreifendere Strukturänderungen von Nukleinsäuren bestehen im Austausch des Ribose-Phosphodiester-Rückgrates gegen verschiedene polymere Konstrukte, die die Nukleinbasen tragen (Abbildung 1.5; A und B). Diese Analoga besitzen weiterhin die Eigenschaft, an Nukleinsäuren zu hybridisieren. Ein Beispiel ist ein auf Hexitol basierender Rückgratstrang [85], oder ein auf Glycerineinheiten basierendes Nukleinsäure-Analogon [86–87].

Morpholino-Oligonukleotide

Ein verbreitetes Nukleinsäure-Analogon, das für *antisense*-Anwendungen Verwendung findet sind Morpholino-Oligonukleotide (Abbildung 1.5; C) [88–89]. Die Struktur basiert auf einem Morpholin-Ring, der die Nukleobase trägt und der über eine nicht ionische Phosphoro-diamidat-Bindung mit dem nächsten Monomer verknüpft ist. Morpholino-Oligonukleotide weisen eine erhöhte Spezifität bei Hybridisierungen auf und sind gegen den Abbau durch Nucleasen resistent.

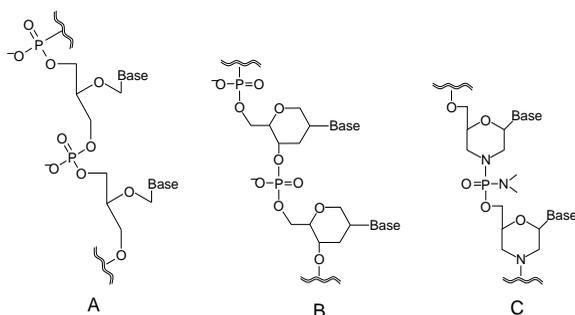


Abbildung 1.5 Nukleinsäure-analoge Verbindungen mit veränderter Rückgratstruktur. Das Phosphodiester-Rückgrat nativer Nukleinsäuren wurde gegen (A) ein Glycerin-basiertes, (B) ein Hexitol-basiertes oder (C) ein Morpholin-basiertes Rückgrat ausgetauscht (Morpholino-Oligonukleotid).

1.3.1 Peptid-Nukleinsäuren (PNA)

Eine grundlegende Änderung der natürlichen Struktur wurde bei den Peptidnukleinsäuren (PNA) eingeführt [90–91]. Diese stellen ein Nukleinsäure-Analogon dar, bei dem das vollständige Ribose-Phosphodiester-Rückgrat durch ein peptidisches, achirales Rückgrat ersetzt wurde, das auf N-(2-Aminoethyl)glycin-Untereinheiten basiert. Die natürlichen Basen sind dabei über eine Carboxymethylen-Einheit mit dem Rückgrat verknüpft (Abbildung 1.6). Ursprünglich wurden Peptid Nukleinsäuren als Liganden für die Erkennung doppelsträngiger DNA entworfen [90,92–94]. Das Konzept sah die Entwicklung eines Nukleinsäure-Analogons vor, das in der Lage war, durch Hoogsteen-Basenpaarung in der großen Furche doppelsträngiger DNA zu binden. Daher blieben die ursprünglichen Nukleobasen erhalten, jedoch wurde das Ribose-Phosphodiester-Rückgrat durch einen elektrisch neutralen und sterisch weniger anspruchsvollen Peptidstrang ausgetauscht, um die Fähigkeit zur Triplex-Bildung zu verbessern [95].

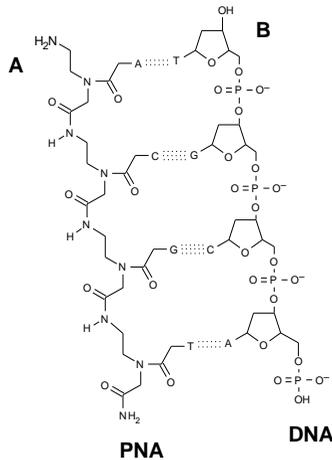


Abbildung 1.6 Vergleich der chemischen Struktur von **A)** PNA und **B)** DNA. Trotz des Namens handelt es sich bei PNA weder um Nucleinsäuren noch um Peptide. PNA hybridisiert vorwiegend in einer antiparallelen Orientierung an Nucleinsäuren, wobei der C-Terminus der PNA am 5'-Ende der Nucleinsäure liegt. Aufgrund der elektrischen Neutralität des PNA-Rückgrates, sind die entstehenden Hybride stabiler, als Nucleinsäure/Nucleinsäure-Hybride. Um die negative Ladung der Carboxyl-Gruppe am C-Terminus der PNA zu eliminieren, liegt diese als Amid vor.

PNA ist in der Lage, analog zu natürlichen Nucleinsäuren an DNA oder RNA zu hybridisieren. Die PNA, die in Analogie zu Peptiden über einen C- und einen N-Terminus verfügt, ist bei der Hybridisierung an RNA oder DNA überwiegend so orientiert, dass der C-Terminus der PNA am 5'-Ende der Nucleinsäure liegt. Diese Orientierung wird als antiparallel bezeichnet und stellt die energetisch günstigere Ausrichtung dar [96–97]. Die parallele Orientierung, bei der der N-Terminus der PNA am 5'-Ende der Nucleinsäure liegt, wird ebenfalls beobachtet, ist jedoch energetisch stark benachteiligt. Der größte Teil der gegenwärtigen Anwendungen für PNA sieht diese als Ersatz für einzelsträngige Nucleinsäuren vor, wobei die Interaktion vorwiegend in Watson-Crick-Basenpaarungen besteht, obwohl die ursprüngliche Konzeption auf der Bildung von Nucleinsäure-Triplexen basierte. Ein hohes Diskriminierungsvermögen bei der Hybridisierung, eine sehr gute Affinität zu komplementären Nucleinsäuren, sowie die biologische und chemische Stabilität machen PNA zu einem vielversprechenden und interessanten Werkzeug in der Nucleinsäure-Analytik. Diese Eigenschaften führten zu zahlreichen Untersuchungen, in denen PNA im Zusammenhang mit therapeutischen oder diagnostischen Fragestellungen als Sonden oder Antisense-Reagenzien eingesetzt wurden. So findet PNA Anwendung in der PCR-Clamping-Technik

[98], bei der Reinigung von DNA und RNA [99], bei der Detektion von *single nucleotide polymorphisms* (SNP) mit Hilfe eines Systems aus PNA und Nukleasen [100], in PNA-Microarrays [101], bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) [102], als *Molecular Beacons* [103–104], bei der allelspezifischen Hybridisierung [105] und bei gentherapeutischen Anwendungen als *antisense*-Wirkstoff [106–108]. Weitere Einsatzmöglichkeiten erschlossen sich in der ortsgerechten und sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA durch einen kombinierten Einsatz aus PNA und S1 Nuklease [109], sowie in der Verwendung von PNA als dirigierende Komponente für Zirkonium(IV)-Komplexe, die zu einer Hydrolyse der Nukleinsäuren führen, um artifizielle sequenzspezifische Restriktionswerkzeuge zu generieren [110].

1.3.2 Chemische und biologische Eigenschaften von PNA

Im Gegensatz zu DNA, die als Polyanionen vorliegt, besitzt PNA ein neutrales Rückgrat. Dieser Unterschied verändert die Interaktion von PNA mit DNA wesentlich. Das Fehlen der elektrostatischen Repulsionskräfte zwischen DNA- und PNA-Strang führt zu einer deutlich höheren Bindungsstärke in einem DNA/PNA-Hybrid im Vergleich zu komplementären DNA/DNA-Hybriden [111–112]. Als Maß hierfür wird die Schmelztemperatur T_m herangezogen, bei der statistisch die Hälfte der Doppelstränge in einem aufgeschmolzenen Zustand vorliegen. Die decamere PNA der Sequenz GTAGATCACT (vom N-zum C-Terminus) weist bei Hybridisierung mit einer komplementären PNA eine Schmelztemperatur von $T_m = 67^\circ\text{C}$ auf. Bei Hybridisierung mit einer komplementären DNA beträgt sie immer noch $T_m = 51^\circ\text{C}$, wobei das DNA-DNA-Hybrid entsprechender Sequenz eine Schmelztemperatur von $T_m = 33.5^\circ\text{C}$ hat [113].

Neben einer hohen Affinität zu komplementären Nukleinsäuren weisen PNA/DNA-Hybride ein ausserordentlich hohes Diskriminierungsvermögen auf, da die Watson-Crick Regeln für die Basenpaarung strenger eingehalten werden, als bei DNA/DNA-Hybriden [114]. Die Schmelzpunkterniedrigung bei einer Fehlpaarung in einem DNA/PNA-Hybrid beträgt 8 bis 20 Kelvin und ist damit etwa doppelt so hoch, wie bei entsprechenden DNA/DNA- oder DNA/RNA-Doppelsträngen [115–116].

Aufgrund der artifiziellen Struktur stellt PNA weder für Nukleasen noch für Peptidasen oder Proteasen ein Substrat dar [117]. Peptid Nukleinsäuren verfügen dadurch neben ihrer bemerkenswerten chemischen Stabilität weiterhin über eine außergewöhnliche Stabilität in biologischen Medien, wie z.B. humanem Serum. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von PNA bei Ratten zeigten bei einer intraperitoneal injizierten Dosis von 10 mg/kg keine generelle

Toxizität [118] und eine urinale Ausscheidung der PNA von 90 % der injizierten Dosis nach 24 h [119–120].

1.3.3 Synthese von PNA

Die Synthese von Peptid Nukleinsäuren verläuft aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur des Rückgrates weitgehend analog zu Peptid-Synthesen. Dabei werden hauptsächlich festphasenbasierte Syntheseverfahren verwendet [121–122], wobei für die Synthese von PNA zwei Hauptmethoden zur Verfügung stehen, die sich grundlegend in der Chemie der verwendeten Schutzgruppen unterscheiden.

Die ersten Peptid Nukleinsäuren wurden unter Verwendung des Boc-Syntheseverfahrens synthetisiert [123], welches sich der tert-Butyloxycarbonylgruppe bedient, um die freie Aminogruppe des entstehenden Peptidstranges bei der Synthese zu schützen. Diese wird nach jeder Kopplung eines neuen Monomers unter Verwendung von Trifluoressigsäure abgespalten. Aminogruppen an den Nucleobasen, wie Adenin, Cytosin und Guanin sind dabei durch die Z-Schutzgruppe geschützt. Diese wird nach der vollständigen Synthese des Stranges durch Trifluormethansulfonsäure abgespalten, wobei auch die fertige PNA von der Matrix eluiert wird. Nachteile des Boc-Syntheseverfahrens bestehen jedoch in der Verwendung von vergleichsweise gefährlichen Reagenzien, dem Mangel an kommerziellen automatisierten Synthese-Apparaturen, sowie den relativ harschen Reaktionsbedingungen, die zwar für die Synthese der PNA unproblematisch sind, die jedoch die Verwendung vieler Konjugate und Markierungsreagenzien verhindern.

Das Fmoc-Syntheseverfahren eröffnet diesbezüglich aufgrund milderer Entschützungs- und Abtrennungsverfahren ein wesentlich größeres Spektrum verwendbarer Konjugate [124–125]. Hierbei werden die Aminogruppen am Peptidstrang während der Synthese durch eine Fluorenylmethyloxycarbonylgruppe (Fmoc), die freien Aminogruppen an den Nucleobasen durch eine Benzhydryloxycarbonylgruppe (Bhoc) geschützt. Die Entschützung nach jeder Kopplung mit Piperidin-Dimethylformamid, sowie die Abtrennung der PNA von der Matrix mit Trifluoressigsäure nimmt lediglich Minuten in Anspruch. Weiterhin stehen hierfür kommerzielle Syntheseverfahren im μmol -Maßstab zur Verfügung, was das Fmoc-Verfahren zum günstigeren und allgemein einfacheren Syntheseverfahren macht. Die Strukturformeln der für dieses Verfahren benötigten Monomere sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

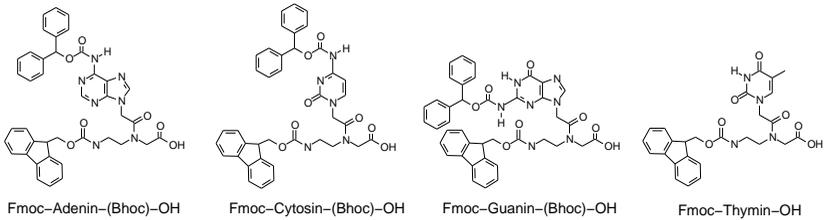


Abbildung 1.7 Strukturformeln der PNA-Monomere für das Fmoc-Syntheseverfahren. Die freien Aminogruppen am Peptidstrang sind durch eine Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc), die Aminogruppen der Nucleobasen durch eine Benzhydryloxycarbonylgruppe (Bhoc) geschützt.

1.3.4 Die räumliche Struktur von PNA

Peptid Nukleinsäuren stellen ein sehr vielversprechendes Struktur analogon natürlicher Nukleinsäuren dar und sind in der Lage, Homoduplexe [126–129], Heteroduplexe [130–132] und Hetero-Triplexe [133] auszubilden, was durch Röntgenstrukturanalysen und NMR Strukturauflösung gezeigt werden konnte. Diese Untersuchungen zeigten, dass PNA im Gegensatz zu DNA oder RNA, die in A- oder B-Helices vorliegen, eine P-Helix bevorzugt [130]. Ebenfalls ist bekannt, dass PNA Homo-Triplexe [134], Hairpin-Strukturen [135] oder Quadruplexe [136] ausbilden kann. Die Wechselwirkungen der Nucleobasen der PNA schließen neben den von RNA und ssDNA bekannten Wechselwirkungen wie Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarung, sowie die Schichtung von Nucleobasen ebenfalls einzelne Wasserstoffbrückenbindungen ein. Es konnte sogar ein Wechsel der Drehrichtung des Stranges innerhalb eines PNA-Moleküls in PNA/PNA-Hybriden beobachtet werden, der durch die gesteigerte Flexibilität des PNA-Rückgrates ermöglicht wurde. Dadurch werden Formen der Nucleobasen-Wechselwirkung bei PNA möglich, die so bei natürlichen Nukleinsäuren unbekannt sind [137].

Bei den bekannten und untersuchten Interaktionen von PNA handelt es sich überwiegend um Hybridisierungen an natürliche Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge und PNA Moleküle. Dabei bestehen die Interaktionen überwiegend in der Ausbildung von Watson-Crick- oder Hoogsteen-Basenpaarung, wie sie auch bei der Wechselwirkung von natürlichen Nukleinsäuren untereinander auftreten.

Da die artifizielle Struktur der PNA eine enzymatische Amplifikation mit herkömmlichen Methoden verhindert, können bekannte evolutionäre Selektionsverfahren, wie SELEX für die Herstellung von PNA-Aptameren nicht herangezogen werden. Aus diesem Grund konnten spezifische Interaktionen

mit anderen Verbindungsklassen, wie z.B. Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, die analog zu RNA- oder DNA-Aptameren aufgrund einer passenden räumlichen Struktur der PNA zu dem jeweiligen Zielmolekül auftreten, bisher nicht gezeigt werden, obwohl sie bei PNA ebenfalls denkbar sind [137].

1.4 Kapillarelektrophorese

Eine Ergänzung zu chromatografischen Trennmethode wie Flüssigkeits-Chromatografie (LC) oder Gas-Chromatografie (GC) stellt die Kapillarelektrophorese (CE) dar [138–139]. Die Einsatzmöglichkeiten erstrecken sich von der Biochemie über die medizinische Forschung und die Lebensmittelchemie bis hin zur analytischen Chemie [140–141]. In der CE wird die elektrophoretische Trennung in Kapillaren mit geringem Innendurchmesser von 10–100 μm durchgeführt, die aus kunststoffumhülltem Quarzglas bestehen. Aufgrund der geringen Bandenverbreiterung ist die Trennung der Komponenten sehr effizient. Die apparative Einheit für die CE ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

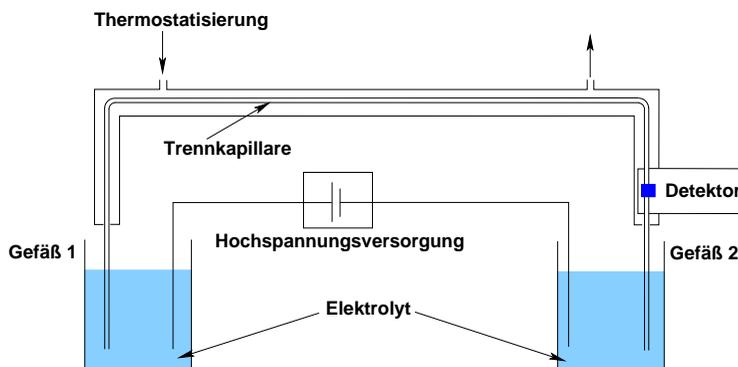


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung einer Apparatur für die Kapillarelektrophorese.

Die Probenaufgabe erfolgt am Ende der Kapillare, wobei nur Lösungen aufgegeben werden können. Zur Probenaufgabe muss das Gefäß mit dem Trennpuffer am aufgabeseitigen Ende der Trennkapillare gegen ein Gefäß ausgetauscht werden, das die Probe enthält. Die Aufgabe der Probe erfolgt durch Druckinjektion (*hydrodynamic injection*), bei der eine einstellbare Druckdifferenz für eine festgelegte Zeit zwischen dem aufgabeseitigen Ende und dem anderen Ende der Kapillare erzeugt wird. Dabei wird ein Fluss in der Kapillare bewirkt und es wird ein festgelegtes Volumen der Probe in die Kapillare aufgenommen. Ein alternatives Verfahren ist die elektrokinetische Injektion

(*electrokinetic injection*). Hierbei wird für eine festgelegte Zeit eine Spannung zwischen beiden Ende der Kapillare angelegt. Aufgrund elektrokinetischer Effekte wird eine Flüssigkeitsströmung in der Kapillare erzeugt, die wiederum ein festgelegtes Volumen der Probe am aufgabeseitigen Ende in die Trennkapillare einführt. Nach der Probenaufgabe wird das Probengefäß gegen ein Gefäß mit Trennpuffer ausgetauscht. In die Elektrolytgefäße an beiden Enden der Kapillare tauchen inerte Elektroden ein. Zwischen diesen Elektroden wird bei Beginn der elektrophoretischen Trennung eine Spannung bis 35 kV angelegt, wodurch die Trennung der Probenbestandteile erfolgt. Die Detektion der Substanzen findet im Allgemeinen in einem Segment der Kapillare (*on-column*) statt.

Um die durch den Stromfluss in der Kapillare erzeugte Wärme (Joulesche Wärme) in ausreichendem Maße an die Umgebung abzuführen, müssen die Innendurchmesser der Kapillaren klein gehalten werden, daher werden überwiegend Kapillaren mit Innendurchmessern von 50–75 μm eingesetzt. Die verwendeten Längen betragen 30–100 cm. Bei Kapillaren mit diesen Abmessungen ist gewährleistet, dass die Temperaturerhöhung in der Kapillare nicht zur Bildung von Gasblasen führt.

Die Trennung von Substanzen in der Kapillarelektrophorese basiert auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen im elektrischen Feld.

$$v = \mu e \cdot E$$

v = Wanderungsgeschwindigkeit; μe = elektrophoretische Mobilität;

E = elektrische Feldstärke

Diese Geschwindigkeitsunterschiede resultieren aus unterschiedlichen Mobilitäten. Die elektrophoretische Mobilität ist eine stoffspezifische Konstante eines Ions und ist in einem Medium bei einem bestimmten pH-Wert definiert. Ein einfaches mathematisches Modell besteht in der Beschreibung der Kräfte, die auf ein Ion wirken. Diese bestehen einerseits aus einer beschleunigenden Kraft, die durch das elektrische Feld hervorgerufen wird,

$$F_e = z \cdot F \cdot E$$

F_e = elektrische Kraft; z = effektive Ionenladung;

F = Faraday Konstante; E = elektrische Feldstärke

andererseits aus der Reibungskraft, die einen bremsenden Effekt hat und die annähernd durch das Stoke'sche Gesetz beschrieben werden kann.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

F_R = Reibungskraft; η = Viskosität des Lösungsmittels

r = Ionenradius; v = Geschwindigkeit

Einleitung

Diese beiden Kräfte stehen zueinander im Gleichgewicht, was zu dem folgenden Zusammenhang führt.

$$\mu e = \frac{z \cdot F}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{oder} \quad v = \frac{z \cdot F}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot E$$

Aus diesem ist ersichtlich, dass Ionen mit einem kleineren Ionenradius eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit besitzen.

Für den Trennungsmechanismus bei der Kapillarelektrophorese ist zusätzlich das Phänomen der Elektroosmose von Bedeutung. Unter Elektroosmose wird die Wanderung der Flüssigkeit in einem gefüllten Kapillar-System im elektrischen Feld aufgrund der Aufladung der Flüssigkeit gegenüber der Wandung verstanden [142]. Durch die negative Ladung der deprotonierten Silanolgruppen an den Innenwänden der Kapillare sammeln sich Kationen in der äußeren Grenzfläche und bilden eine diffuse Schicht mit einer effektiven positiven Ladung. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bewegt sich diese Schicht auf die Kathode zu und zieht die Lösungsmittelmoleküle in der gesamten Kapillare mit. Elektroosmose bewirkt eine konstante Flüssigkeitsströmung, die als Elektrosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet wird (Abbildung 1.9, Figur A). Die hohe Trennleistung der Kapillarelektrophorese ist in einem extrem flachen Strömungsprofil begründet, da der EOF im Gegensatz zu Strömungen, die durch Druckdifferenzen hervorgerufen werden, an den Wänden der Kapillare entsteht (Abbildung 1.9, Figur B). Damit werden die Zonen in der Kapillare kaum verbreitert, was zur schärferen Trennungen beiträgt. Der Elektrosmotische Fluss wird durch die elektrophoretische Wanderung der Teilchen überlagert, was dazu führt, dass positiv geladene Ionen in Bezug auf den EOF eine höhere und negative geladene Ionen eine niedrigere effektive Geschwindigkeit aufweisen (Abbildung 1.9, Figur C).

In verschiedenen Anwendungen der CE wird der Elektrosmotische Fluss durch eine Beschichtung an der Innenseite der Kapillare, die aus verschiedenen Polymeren wie Polyacrylamid [143–145], Polyvinylalkohol [146], Polyethylenglycol [147] u.ä. bestehen kann, reduziert bzw. vollständig unterdrückt. Die Ionen wandern in diesem Fall entsprechend ihrer Ladung entweder auf die Anode oder die Kathode zu. Neutrale Teilchen erfahren dabei keine Migration.

Mizellare Elektrokinetische Chromatografie

Die Mizellare Elektrokinetische Chromatografie kann als Variante der Kapillarelektrophorese betrachtet werden. Abgesehen von Verfahren, bei denen

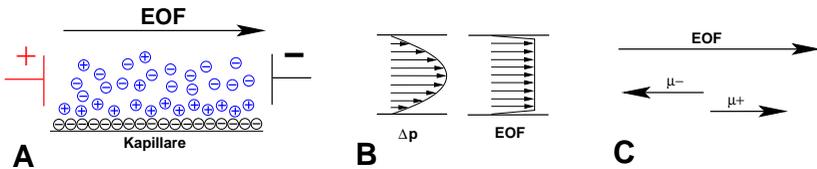


Abbildung 1.9 (A) Schematische Darstellung des Elektroosmotischen Flusses (EOF). An den Silanolgruppen auf der Glasoberfläche sammeln sich Kationen und bilden eine diffuse Schicht mit einer Dicke von einigen Nanometern. Aufgrund des elektrischen Feldes bewegt sich diese Schicht auf die Kathode zu und zieht die Lösungssäule in der Kapillare mit. (B) Da der EOF durch die Wanderung der Kationenschicht an den Wänden der Kapillare entsteht, weist er ein extrem flaches Strömungsprofil im Gegensatz zu druckbedingten Strömungen auf. Damit werden die Zonen in der Kapillare kaum verbreitert, was zu schärferen Trennungen und einer hohen Trennleistung der Kapillarelektrophorese beiträgt. (C) Der Elektroosmotische Fluss wird durch die elektrophoretische Wanderung der Teilchen überlagert, die Geschwindigkeitsvektoren werden addiert, wodurch die Geschwindigkeit positiv geladener Ionen höher und die, negativ geladener Ionen niedriger, als die Geschwindigkeit des EOF ist.

die zu trennenden Substanzen durch Komplexbildung oder Derivatisierung in Verbindungen mit einer elektrophoretischen Beweglichkeit überführt werden, kann die CE prinzipiell nur zur Trennung geladener Komponenten herangezogen werden. Diese methodische Begrenzung wurde durch Benutzung von Hintergrundelektrolyten aufgehoben. Hierfür werden Trennpuffer verwendet, die ein in Ionen dissoziierendes Tensid in einer Konzentration oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) enthalten. Diese Methode wird als Mizellare Elektrokinetische Chromatografie (MEKC) bezeichnet [148–149]. Die kritische Mizellkonzentration ist die Konzentration, oberhalb welcher das gelöste Tensid Aggregate, die Mizellen, ausbildet. Die CMC ist nicht nur abhängig von der Temperatur, sondern auch vom Lösungsmittel und der Konzentration weiterer gelöster Komponenten, die in der Regel zur Pufferung zugegeben werden. Die in Trennelektrolyten der MEKC vorhandene Mizellphase ist aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit gegenüber der elektroosmotisch erzeugten Strömung in der Kapillare versetzt. Auch ungeladene Komponenten eines Gemisches können daher aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkung mit dem Detergenz bzw. der Mizellphase und dem damit verbundenen Gleichgewicht zwischen der wässrigen Phase und den Mizellen in Zonen aufgetrennt werden.

Das der MEKC zugrunde liegende Prinzip ist somit vergleichbar mit der Trennung in einer Verteilungs-Chromatografie, daher zählt die MEKC zu den chromatografischen Methoden, obwohl unter bestimmten Voraussetzungen auch Elektrophorese als Trennprinzip wirken kann. Die Mizellare Elektrokinetische Chromatografie unterscheidet sich von der Kapillarelektrophorese durch die

Zusammensetzung des Trennpuffers. Der apparative Aufbau ist hingegen bei beiden Methoden identisch.

1.5 Aufgabenstellung

Einzelsträngige Nukleinsäuren bilden aufgrund intramolekularer Hybridisierung dreidimensionale Strukturen aus, durch die sie spezifisch Zielmoleküle mit hoher Affinität binden können. Nachteile der Aptamere aus natürlichen Nukleinsäuren sind jedoch die begrenzte chemische bzw. biologische Stabilität, sowie die negative Ladung des Rückgrates, die sich bei der Selektion gegen Zielmoleküle, die ebenfalls Ladungen tragen, negativ auswirken kann. Es ist belegt, dass auch PNA aufgrund von intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Nukleobasen Strukturen höherer Ordnung ausbilden kann, wie es bei DNA und RNA beobachtet wird. Weiterhin wurden Konformationen von PNA aufgeklärt, die sich nicht in die von DNA und RNA bekannten Konformationsklassen einordnen lassen. Dies lässt bei Peptid Nukleinsäuren möglicherweise auf ein noch größeres Repertoire an intramolekularen Interaktionen und einer höheren strukturellen Diversität schließen als bei RNA oder ssDNA [137]. Diese Fakten legen die Existenz von PNA-Molekülen mit bestimmten Eigenschaften wie Affinitäten (PNA-Aptamere) oder katalytischen Funktionen (PNAzyme) nahe.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung und Evaluierung von Methoden, die die Isolierung von Peptid Nukleinsäuren mit Affinität für ein Zielmolekül aus einer Bibliothek erlaubten. Hierfür sollten Verfahren zur effizienten Abtrennung von PNA/Zielmolekül-Komplexen und PNA-Molekülen entwickelt werden. Ansätze hierfür sahen die Immobilisierung des Zielmoleküls und die Entfernung nicht bindender PNA-Moleküle durch Waschen vor. Alternativ sollten Methoden entwickelt werden, die eine chromatografische oder elektrophoretische Trennung nicht bindender PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexen ermöglichten.

Da weder Technologien für die Amplifikation von PNA, noch für deren Sequenz-Analyse existieren, bestand ein weiteres Ziel der Arbeit darin, eine Methode zu entwickeln, mit der Peptid Nukleinsäuren auch in geringen Mengen sequenziert werden können. Hierbei sah der Ansatz einen Transfer der Sequenzinformation von PNA auf DNA und damit auf ein amplifizierbares System vor, aus dem die Informationen zu einem späteren Zeitpunkt ausgelesen werden konnten.

2 Material

Chemikalien

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Appllichem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Biomol Feinchemikalien (Hamburg), Calbiochem (Schwalbach), Fluka (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Peqlab (Erlangen), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Enzyme

Restriktionsendonukleasen des Typs II, Mungobohnen Nuklease, T4 DNA Ligase, T4 RNA Ligase, *Calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP), DNaseI, S1 Nuklease, Polynukleotid Kinase, Proteinase K und die dazugehörigen Puffer wurden von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Restriktionsendonukleasen des Typs IIs, *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase und DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase wurden von NEB (Frankfurt) bezogen. RNase, Myokinase und Kreatinkinase wurde von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Affinitätsmatrices und Partikel

Ni-NTA-Agarose wurde von Qiagen (Hilden), Streptavidin-Magnetpartikel und Streptavidin-Agarose von Sigma (Taufkirchen) und Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße von Roche (Mannheim) bezogen.

Kits

QIAEX II *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden)
QIAprep *Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden)
BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Geräte

Eppendorf (Hamburg)	Tischzentrifugen 5417R, 5417R, 5415R, 5804R und <i>MiniSpin</i> Thermocycler Gradient und Personal Thermomixer compact und comfort
Intas (Göttingen)	Gel-Dokumentationssystem UV-Transilluminator
Amersham Biosciences (Freiburg)	Gel-Gießstand, Multi-Cast, SE200 vertikale Gel-Laufkammer Mighty Small
Gössner GmbH & Co. (Hamburg)	Laborautoklav GLA; Fabr. Nr. 940306
Bio-Rad (München)	System für Agarosegelelektrophorese; <i>Sub Cell GT</i> Netzteil für Gelelektrophorese <i>PowerPac Basic</i> Netzteil für Gelelektrophorese <i>PowerPac 1000</i>
USF (Ransbach-Baumbach)	Wasserfilter-Anlage PURELAB Plus PL5121
Applied Biosystems (Weiterstadt)	Kapillarelektrophorese-System 270A
Dionex (Idtein)	HPLC-Pumpe P580 UV-Vis-Detektor UVD 340S Auswertungs-Software Chromeleon Version 6.4
Shimadzu (Duisburg)	Nano-HPLC Anlage zwei Pumpen LC-10AD VP Entgaser DGU-14A Steuerungseinheit SCL-10A VP Autoinjektor SIL-10AD VP UV-Vis-Detektor SPD-10AV VP Säulenofen CTO-10AS VP Lösungsmittel-Splitter
Abimed, Gilson	Fraktionssammler 221 XL <i>Liquid Handler</i>

Christ GmbH (Ostero- de)	Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD
Thermo Spectronic (Rochester, USA)	Photometer, BioMate3
PeqLab (Erlangen)	Spectrophotometer Nanodrop
Varian (Darmstadt)	Spectrophotometer Cary 50 UV-Vis Nanodrop

HPLC-Säulen

Bei den verwendeten HPLC-Säulen handelte es sich ausschließlich um Säulen mit unpolaren (*reverse phase*) Matrices. Für analytische Trennungen wurden Säulen mit einem Innendurchmesser bis 4,6 mm verwendet, für semi-präparative und präparative Trennungen, Säulen mit einem Innendurchmesser von 10 bzw 20 mm. Die verwendeten Säulen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Säule	Firma	Belegung	ID	Länge
214TP54	Vydac	C4	4,6 mm	25 cm
208TP54	Vydac	C8	4,6 mm	25 cm
218TP54	Vydac	C18	4,6 mm	25 cm
214TP510	Vydac	C4	10 mm	25 cm
208TP510	Vydac	C8	10 mm	25 cm
218TP1010	Vydac	C18	10 mm	25 cm
Vydac300	Vydac	C18	20 mm	25 cm
PepMap C18 Säule	LC-Packings	C18	1 mm	10 cm

Tabelle 2.1 Verwendete *reverse phase*-Säulen für die HPLC.

Bakterienstämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α (Promega, Mannheim) wurde für die Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurde für die rekombinante Expression von Proteinen verwendet. Der Stamm HB2151 wurde für die Amplifikation des Plasmides pZero2 genutzt.

Material

Stamm	Genotyp
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (ϕ 801Z Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1
BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS($r_B^-m_B^-$) gal λ (DE3) pLysS Cam ^r
HB2151	Nalr thi-1 ara (lac-proAB(F ⁻ proAB+laciq lacZ(M15)))

Tabelle 2.2 Genotypen der verwendeten Bakterienstämme

Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert und sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Peptid-Nukleinsäuren (PNA)

Peptid Nukleinsäuren wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Voelter (Tübingen) und von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Plasmide

pET26DHFR-His	Der Vektor pET26DHFR-His stand im Arbeitskreis zur Verfügung und wurde für die Expression der DHFR in <i>E. coli</i> verwendet.
pUC18/19	Die Vektoren pUC18/19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurden für die Klonierung verwendet.
PCRTopo	Der Vektor PCRTopo wurde für die Ligation und Sequenzierung von PCR Produkten verwendet.
pZero2	Der Vektor pZero2 wurde ebenfalls für die Ligation und Sequenzierung von PCR Produkten verwendet.

Quarzkapillaren

Unbelegte Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 50–250 μ m und einem Aussendurchmesser von 360 μ m zur Verwendung in der Kapillarelektrophorese, wurden bei der Chromatographie Service GmbH (Langerwehe) bezogen.

Name	Sequenz 5'-3'
15mer	GGT GCA AGC GTT AAT
16mer	GGT GCA AGC GTT AAT C
2x4mer Lig 3'	Pho-ATC GGG ATC TGA G
2x4mer Lig 3' rev	CTC AGA TCC CGA T
2x4mer Lig 5'	CAT TAG TTG GTG
3merA	Pho-GGT
4mer deg	Pho-NNN N
4mer Lig 3'	Pho-TAA TCG GGA TCT GAG
4mer Lig 3'rev	CTC AGA TCC CGA TTA
4mer Lig 5'	CAT TAG TTG GTG CAA
4mer Lig 5' check	CAT TAG TTG GTG CAA GCG
4merA	GGT G
4merB	Pho-CAA G
4merC	Pho-CGT T
4merD	Pho-AAT C
5merA	GCA AG
5merB	Pho-CGT TA
5merC	Pho-ATC GG
6merA	Pho-GGT GCA
6merB	Pho-AGC GTT
6merC	Pho-AAT CGG
A-PNA	GGT GCA AGC
APos2(5)	ATT CTA TCA CGA GTC NNN NNN NNN
APos2(5)(-1)D2-1rev	ATT CTA TCA CGA GTC GGT GCA AG
APos2(5)(-3)D2-1rev	ATT CTA TCA CGA GTC GGT GCA
APos2(5)D2-1rev	ATT CTA TCA CGA GTC GGT GCA AGC
ApPos2(5)	ATT CTA TCA CGA GTC NNN NNN NNN-Pho
ApPos2(5)D2-1rev	ATT CTA TCA CGA GTC GGT GCA AGC-Pho
B-PNA	GTT AAT CGG
B2Pos2(5)D2-1rev	GTT AAT CGG GAT ATG AGG ATC CCA

Tabelle 2.3α Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
BPos2(5)	NNN NNN NNN GAT ATG AGG ATC CCA
BPos2(5)D2-1rev	GTT AAT CGG GAT ATG AGG ATC CCA
BPos2(6)	NNN NNN NNN CCA TAG GAT AGA TCG
BPos2(6)D2-1rev	GTT AAT CGG CCA TAG GAT AGA TCG
BPos2(7)	NNN NNN NNN GCT GAT GGT AAG CTA
D2-1	CCG ATT AAC GCT TGC ACC
D2-1 rev	GGT GCA AGC GTT AAT CGG
DHFR-HindIII (back)	GAT CCA GCT TTT ATT TCG CCT TTT TCC GCT C
DHFR-NdeI (for)	GAT CCA TAT GAG AGG ATC GCA TCA CC
M13 forward (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 forward (-40)	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13 sequ Primer	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG A
pBPos2(5)D2-1rev	Pho-GTT AAT CGG GAT ATG AGG ATC CCA
pBPos2(6)	Pho-NNN NNN NNN CCA TAG GAT AGA TCG
pBPos2(7)	Pho-NNN NNN NNN GCT GAT GGT AAG CTA
pBPos2(7)D2-1rev	Pho-GTT AAT CGG GCT GAT GGT AAG CTA
Pho-2mer deg	Pho-NN
Pho-3mer deg	Pho-NNN
Pho-Pos(HindIII)	CTT CTG CGA TCC AAG
Pho-Pos4(5)rev	Pho-GAT ATG AGG ATC CCA
Pho-Pos4(8)rev	Pho-CTG CGA TCA TCT C
Pho-Pos4rev	Pho-GAT ATC AGG ATC CCA
Pos(HindIII)fw+3	CTT CTG CGA TCC AAG GGT
Pos(HindIII)rev	CTT GGA TCG CAG AAG
Pos(HindIII)rev+3	CTT GGA TCG CAG AAG CCG
Pos2	GAA TTC CAG ATC TCT NNN NNN NNN NNN NNN NNN GAT ATC AGG ATC CCA
Pos2(2)D2-1rev	GAA TTC CAG ATC TCT GGT GCA AGC GTT AAT CGG GGA CTC CTC AGA TAA

Tabelle 2.3β Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
Pos2(3)D2-1rev	ATT TAT GAG GAG TCC GGT GCA AGC GTT AAT CGG GAT ATC AGG ATC CCA
Pos2(4)D2-1rev	ATT TAT GAG GAG TCC GGT GCA AGC GTT AAT CGG GGA CTC CTC AGA TAA
Pos2(5)	ATT CTA TCA CGA GTC NNN NNN NNN NNN NNN NNN GAT ATG AGG ATC CCA
Pos2(5)D2-1rev	ATT CTA TCA CGA GTC GGT GCA AGC GTT AAT CGG GAT ATG AGG ATC CCA
Pos2(XbaI)D2-1rev	GAA TTC CAG ATC TCT GGT GCA AGC GTT AAT CGG TCT AGA CAG GAT CCA
Pos2(XbaI2)D2-1rev	GAA TTC CAG TCT AGA GGT GCA AGC GTT AAT CGG ATC AGA CAG GAT CCA
Pos2D2-1rev	GAA TTC CAG ATC TCT GGT GCA AGC GTT AAT CGG GAT ATC AGG ATC CCA
Pos3	GAA TTC CAG ATC TCT
Pos3(3)	ATT TAT GAG GAG TCC
Pos3(3)rev	GGA CTC CTC ATA AAT
Pos3(5)	ATT CTA TCA CGA GTC
Pos3(5)rev	GAC TCG TGA TAG AAT
Pos3rev	AGA GAT CTG GAA TTC
Pos4	TGG GAT CCT GAT ATC
Pos4(2)	TTA TCT GAG GAG TCC
Pos4(5)	TGG GAT CCT CAT ATC
Pos4(5)+4	TGG GAT CCT CAT ATC CCG A
Pos4(5)rev	GAT ATG AGG ATC CCA
Pos4(6)	CGA TCT ATC CTA TGG
Pos4(7)	TAG CTT ACC ATC AGC
Pos4(8)+4	GAG ATG ATC GCA GCC GA
Pos4(XbaI)	TGG ATC CTG TCT AGA
Pos4+2	TGG GAT CCT GAT ATC CC
Pos4+4	TGG GAT CCT GAT ATC CCG A

Tabelle 2.3 γ Verwendete Oligonukleotide

Material

Name	Sequenz 5'-3'
Pos4rev	GAT ATC AGG ATC CCA

Tabelle 2.3δ Verwendete Oligonukleotide

Puffer

BCA-Lösung A	1 % (w/v)	BCA
	2 % (w/v)	Na ₂ CO ₃ * H ₂ O
	0,16 % (w/v)	Natriumtartrat
	0,4 % (w/v)	NaOH
	0,95 % (w/v)	NaHCO ₃ , pH 11,25
BCA-Lösung B	4 % (w/v)	CuSO ₄ * 5H ₂ O
BCA-Lösung C	50 Teile	BCA-Lösung A
	50 Teile	BCA-Lösung B
CNBr-Blockpuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 8
	60 mM	NaCl
	20 mM	MgCl ₂
Coomassie-Entfärbe-Lösung	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
Coomassie-Färbe-Lösung	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
Denhart's Lösung 100x	2 % (w/v)	BSA
	2 % (w/v)	Ficol (400 kDa)
	2 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidone (40 kDa)
		Verdünnen in 3x SS-PE
Entwicklerlösung (DNA-Silberfärbung)	24 mM	Natriumcarbonat

Entwicklerlösung (Protein-Silberfärbung)	260 mM	Natriumcarbonat
	0,6 % (v/v)	Formaldehyd (37 %ig)
Färbelösung (DNA-Silberfärbung)	12 mM	Silbernitrat
	4 mM	p-Toluolsulfonsäure
Färbelösung (Protein-Silberfärbung)	6 mM	Silbernitrat
	0,6 % (v/v)	Formaldehyd (37 %ig)
Fixierlösung (DNA-Silberfärbung)	32 mM	p-Toluolsulfonsäure
	24 % (v/v)	Ethanol
Fixierlösung (Protein-Silberfärbung)	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Eisessig
Inkubationslösung (Protein-Silberfärbung)	25 % (v/v)	Ethanol
	14 mM	Natriumthiosulfat
	0,5 M	Natriumacetat
	0,5 % (v/v)	Glutardialdehyd (25 %)
Loading Dye (6x)	10 mM	Tris-HCl, pH 7.6
	0,03 %	Bromphenolblau
	0,03 %	Xylenylanol FF
	60 % (v/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
Lösung I	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris-HCl, pH 8
	10 mM	EDTA
	autoklavieren	Lagerung bei 4 °C
Lösung II	0,2 M	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Lösung III	3 M	Kaliumacetat
	11,5 % (v/v)	Essigsäure
	autoklavieren	Lagerung bei 4 °C

Material

Mungobohnen Nuklease Reaktionspuffer	50 mM	Natriumacetat, pH 5
	30 mM	NaCl
	1 mM	ZnSO ₄
PBS	0,1 M	NaCl
	15 mM	NaH ₂ PO ₄
	33 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2
PCR-MlyI-Puffer (10x)	100 mM	Tris-Essigsäure, pH 8,3
	300 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MgAc ₂
	10 µg/ml	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween 20
PCR-Puffer 3 (10x)	100 mM	Tris-Essigsäure, pH 8,3
	500 mM	Kaliumacetat
	50 mM	Magnesiumacetat
	10 µg/ml	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween 20
PCR-Puffer 5 (10x)	200 mM	Tris-Essigsäure, pH 8,0
	500 mM	Kaliumacetat
	50 mM	Magnesiumacetat
	0,1 % (v/v)	Tween 20
PCR-Puffer 7 (10x)	400 mM	Tris-Essigsäure, pH 8,7
	100 mM	Kaliumacetat
	50 mM	Magnesiumacetat
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1 % (v/v)	Tween 20
Phenol/Chloroform	50 % (v/v)	Phenol (Tris-gepuffert, pH 7,6–8)
	50 % (v/v)	Chloroform

Puffer C (10x)	100 mM	Natriumacetat, pH 5
	200 mM	NaCl
	500 μ M	ZnSO ₄
	50 mM	MgSO ₄
Puffer D (10x)	100 mM	Kaliumacetat, pH 4,6
	1 M	NaCl
	1 mM	ZnSO ₄
	50 mM	MgSO ₄
S1-Nuklease Reaktionspuffer (5x)	200 mM	Natriumacetat, pH 4,5
	1,5 M	NaCl
	10 mM	ZnSO ₄
Sammelgelpuffer (4x)	1,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
SDS-Probenpuffer (4x)	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (v/v)	Glycerin
	0,004 % (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	reduzierend: DTT
Sonifizierungs-Puffer	60 mM	NaHPO ₄ pH 8,5
	300 mM	NaCl
SSC 20x	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat, pH 6,2
SSPE 20x	3 M	NaCl
	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
	20 mM	EDTA
Standard PCR-Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	10 mM	KCl
	2 mM	MgSO ₄
	0,1 % (v/v)	Triton X-100

Material

Stoplösung (Silberfärbung)	50 mM	EDTA
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	400 mM 100 mM 100 mM 5 mM	Tris-HCl, pH 7,8 MgCl ₂ DTT ATP
TAE-Puffer (50x)	2 M 50 mM pH 8,5	Tris-Acetat EDTA
Tankpuffer (5x)	125 mM 960 mM 0,5 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8,3 Glycin SDS
TBE-Puffer (5x)	850 mM 850 mM 20 mM pH 8	Tris-Borat Borsäure EDTA
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
TSS-Lösung	85 % (v/v) 10 % (w/v) 5 % (v/v) 50 mM	LB-Medium, pH 6,2 PEG 8000 DMSO MgCl ₂
Waschpuffer (Gimble)	0,3 M 60 mM 2 mM 1 % (w/v)	NaCl Tris-HCl, pH 8,0 EDTA SDS
Waschpuffer 2	0,2 M 10 mM 1 mM 0,1 % (v/v)	NaCl Tris-HCl, pH 7,5 EDTA Tween 20

Medien

LB-Medium mit Agarose	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	15 g	Agar
	ad 1 l ddH ₂ O	autoklavieren
LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	ad 1 l ddH ₂ O	autoklavieren
SOB-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0.5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
		Mischung ohne MgCl ₂ auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren. Anschließend sterile MgCl ₂ -Lösung (1M) zugeben.
SOC-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0.5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	20 mM	Glucose
	Sterile Glucose-Lösung (1 M) zu SOB-Medium geben.	

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Sambrook *et al.* durchgeführt [150]. Die verwendeten Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert bzw. mit Ethanol sterilisiert. Durch die Verwendung einer Bunsenbrennerflamme wurden Kontaminationen aus der Luft verhindert. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde entweder einfach deionisiertes Wasser oder hochreines Wasser aus der Filteranlage PURELAB Plus PL5121 02 (USF, Ransbach-Baumbach) verwendet. Bestimmte Puffer und Lösungen wurden zusätzlich mittels einer Filtervorrichtung (Nalgene, Neerijse, Belgien) durch einen sterilen Filter (0,22 μm) der Firma Millipore (Schwalbach) filtriert. Die Durchführung dieser Arbeit fand in einem S1-Labor (Sicherheitsstufe 1: Keine Gefährdung von Beschäftigten oder der Umwelt) gemäß des Gentechnikgesetzes statt. Sämtliche Organismen wurden vor der Entsorgung durch Sterilisation abgetötet.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Vervielfältigung von DNA-Bereichen zwischen bekannten Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet [151–152]. Zwei zu den bekannten Sequenzen komplementäre DNA-Fragmente dienten dabei als Primer. Die Synthese der DNA erfolgte durch thermostabile Polymerasen (Taq-DNA-Polymerase oder DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase). Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Vervielfältigung der DNA in einem 50 μl PCR-Ansatz, der die in Tabelle 3.1 gezeigten Komponenten enthielt.

5 μl	Standard PCR-Puffer
5 μl	dNTP-Lösung (2 mM je dNTP)
5 μl	Sense-Primer (10 μM)
5 μl	Antisense-Primer (10 μM)
0–29 μl	gelöste PCR-Vorlage
0,2–1 μl	DNA-Polymerase Lösung
ad 50 μl	H ₂ O

Tabelle 3.1 Komponenten in einem PCR-Ansatz

Die Reaktionsmischungen wurden, soweit nicht anders angegeben, den in Tabelle 3.2 aufgeführten Temperaturzyklen unterworfen.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Primärdenaturierung	30 s–1 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Hybridisierung	1–2 min	45 °C–67 °C
4. Elongation	1–2 min	72 °C
25–35 Zyklen (Schritt 2–4)		
5. Terminale Elongation	5–10 min	72 °C

Tabelle 3.2 PCR-Temperaturprogramm.

Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen

Proteine wurden aus einer DNA-Lösung extrahiert, indem diese mit einem Äquivolumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gevortext wurde. Die Emulsion wurde anschließend 10 min bei 1.700 xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die Prozedur so lange wiederholt, bis kein weißes Material an der Interphase mehr sichtbar war.

Alkoholpräzipitation von DNA

Für die Alkoholpräzipitation von DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen kaltes Ethanol (96 % v/v) zur DNA-Lösung gegeben. Die Mischung wurde 20 min bei 4 °C inkubiert und 20 min bei 20.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 20.000 xg wurde der Überstand entfernt, die DNA 30 min bei RT getrocknet und in einem gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde direkt nach einer Restriktionsverdauung in den jeweiligen Reaktionsansätzen durchgeführt. Dazu wurde zum Restriktionsansatz 1 µl CIAP (MBI-Fermentas, St. Leon Rot) gegeben und das Reaktionsgemisch 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde erneut 1 µl CIAP zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch eine anschließende elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente beendet. Alternativ wurde die Dephosphorylierung mit *shrimp alkaline phosphatase* (SAP)

durchgeführt, wobei die Reaktion alternativ durch eine Hitze-Inaktivierung (15 min; 65 °C) gestoppt werden konnte.

Vervielfältigung von Plasmid-DNA

Die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde in transformierten *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α durchgeführt. LB Medium (3 ml) das ein dem Resistenzgen der Plasmid-DNA entsprechendes Antibiotikum enthielt (70–100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicilin oder 30–50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. 2 ml der Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4 min, 20.000 xg, Raumtemperatur). Der Überstand wurde entfernt und die Plasmid-DNA aus den sedimentierten Zellen isoliert.

Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Extraktion

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Extraktion durchgeführt [153]. Die pelletierten Zellen aus 2 ml einer Bakterienkultur wurden in 100 μl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 μl Lösung II zugegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 μl Lösung III wurde wiederum mehrfach invertiert, für 5 min bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (5 min, 20.000xg, 4 °C). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 400 μl Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA anschließend durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 xg wurde das Pellet mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 20 μl TE aufgenommen und mit 0,5 μl RNase (10 mg/ml) versetzt.

Isolierung von Plasmid-DNA mittels kommerzieller Kits

Alternativ wurde die Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mittels des QIA-prep *Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) extrahiert und gereinigt. Die Präparation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

Photometrische Quantifizierung von DNA

60 μl DNA-Lösung wurde in eine Küvette (UVette, Eppendorf AG, Hamburg) gegeben und die optische Dichte der Lösung bei 260 und 280 nm im Photometer (BioMate3, Thermo Spectronic, Rochester, USA) vermessen. Die DNA-Konzentration wurde errechnet, indem der Wert für OD_{260} mit dem Faktor 50 $\mu\text{g DNA/ml}$ multipliziert wurde. Informationen über die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ erhalten, der bei reiner DNA idealerweise 1,8–2,0 betragen sollte.

Restriktionverdauung von Plasmid-DNA

Die Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA wurde in Reaktionsansätzen mit einem Volumen von 10–100 μl durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen gehörten dem Typ II an. Die Ansätze enthielten variierende Mengen der DNA-Lösung, 10x Puffer für das entsprechende Restriktionsenzym und 0,5–1 μl der Restriktionsenzym-Lösung. Die Inkubationszeit der Reaktionen betrug 2–16 h bei 37 °C. Die Reaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung bei 65–85 °C, durch Alkoholpräzipitation der DNA oder durch anschließende elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte gestoppt. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden, von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

Photometrische Quantifizierung von PNA

Für die photometrische Bestimmung der PNA-Konzentration in einer Lösung wurde der molare Extinktionskoeffizient bei 260 nm errechnet, indem die molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Nukleobasen mit ihrer Anzahl in der PNA Sequenz multipliziert und die Werte anschließend addiert wurden. Dabei wurden für die Nukleobasen an der PNA folgende Werte verwendet. Adenin: 13,7 $\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Cytosin: 6,6 $\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Guanin: 11,7 $\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Thymin: 8,6 $\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die optische Dichte der PNA-Lösung bei 260 nm wurde im Photometer (BioMate3, Thermo Spectronic, Rochester, USA) vermessen und der erhaltene Wert durch den molaren Extinktionskoeffizienten dividiert und mit der Dicke der Lösung (1 cm) multipliziert. Der so erhaltene Wert entsprach der PNA-Konzentration in μM . Bei randomisierten PNA Sequenzen wurden für die Anzahl der jeweiligen Nukleobasen ein Viertel der Anzahl der Monomere in der PNA angenommen.

Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Länge ab 100 bp wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurde für die Auftrennung von Fragmenten bis 200 bp 3 %, für 200–1000 bp 2 % und für Fragmente über 1000 bp 1 % Agarose (SeaKem LE Agarose, Biozym, Oldendorf) in TAE-Puffer verwendet. Vor der Benutzung wurde die Agarose durch Kochen im TAE-Puffer gelöst. Die Proben wurden vor der Applikation auf horizontale Agarose-Gele mit 6x *Loading Dye* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Als DNA-Standard diente λ -DNA/Eco130I oder pUC19/MspI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die DNA-Fragmente wurden bei 90–130 V in einer Elektrophoresekammer in TAE-Puffer aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch 20 min Inkubation bei RT in einer Ethidiumbromid-Lösung (4 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt, mittels eines UV-Transilluminators bei 302 nm detektiert und mit einem Videosystem (Intas, Göttingen) dokumentiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) verwendet, wobei die Reinigung auf der Bindung von DNA an Silika-Partikeln basiert [154]. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Subklonierung von dsDNA-Fragmenten

Die für die Klonierung verwendete Plasmid-DNA wurde mit einem dreibis fünffachen molaren Überschuss an einzufügender DNA versetzt. Es wurden 2 μl T4 DNA Ligase-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 1 μl T4 DNA Ligase (5 U/ μl , MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 20 μl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde 15 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligationsreaktion durch eine Hitzeinaktivierung (20 min; 65 °C) abgebrochen und die erhaltene DNA-Lösung in einer Transformation eingesetzt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) für DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge unter 100 bp, sowie für die Auftrennung von einzelsträngiger DNA unter denaturierenden Bedingungen wurden 15 oder 20 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Diese enthielten Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1 (w/w)

und 1 $\mu\text{l/ml}$ TEMED in TBE-Puffer. Für die Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen war zusätzlich 8 M Harnstoff und gegebenenfalls 10 % (v/v) F (v/mid) enthalten. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 5 $\mu\text{l/ml}$ 10%iger APS-Lösung gestartet. Die Herstellung von jeweils 5 Gelen gleichzeitig erfolgte in einem entsprechenden Gelgießstand (Multi-Cast, SE200, Amersham Biosciences, Freiburg). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x *Loading Dye* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und unter Verwendung von vertikalen Laufkammern (Mighty Small, Amersham Biosciences, Freiburg) in TBE-Puffer aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch 5 min Inkubation bei RT in einer Ethidiumbromid-Lösung (4 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt, mittels eines UV-Transilluminators bei 302 nm detektiert und mit einem Videosystem (Intas, Göttingen) dokumentiert.

Elution von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen

Zum Zweck einer spezifischen Amplifikation von kurzen DNA-Fragmenten aus einer Mischung wurden diese mittels einer PAGE aufgetrennt und in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von UV-Licht detektiert und aus dem Gel herausgetrennt. Die Gelfragmente wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml H_2O gewaschen und anschließend mit einer Kanüle zerkleinert. Nach Zugabe von 100–200 μl H_2O wurde die Suspension 3 h bei 65 °C geschüttelt. Das Polyacrylamid wurde durch 30 s Zentrifugation der Suspension bei 10.000 xg in einer 1 ml-Zentrifugationssäule (Micro Bio-Spin Column, Bio-Rad, München) aus der Lösung entfernt. Das Zentrifugat wurde anschließend direkt in einer PCR eingesetzt oder gefriergetrocknet.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer Methode von Chung *et al.* [155]. Eine 3 ml Bakterienkultur wurde mit *E. coli* DH5 α -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurde eine 100 ml Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,6$ kultiviert. Anschließend wurde die Kultur 5 min bei 1.200 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml kalter TSS-Lösung resuspendiert, in 500 μl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von DH5 α -Zellen wurden 50 μ l der Zellsuspension zu der DNA gegeben. Nach 25 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis gelagert, 200 μ l SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. 50–200 μ l der Zellsuspension wurde auf LB-Agar, das ein dem Resistenzgen der Plasmid-DNA entsprechendes Antibiotikum enthielt (70–100 μ g/ml Ampicilin oder 30–50 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert. Die Platten wurden invertiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung salzfreier, elektrokompetenter Zellen wurde eine 3 ml Bakterienkultur mit *E. coli* DH5 α -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurde eine 500 ml Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden durch 5 min Zentrifugation bei 1.200 xg und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 ml kaltem H₂O resuspendiert. Pelletieren und Waschen der Bakterien wurde bei 4 °C drei weitere Male wiederholt, bevor das Bakterienpellet in 2–5 ml kalter 10 %iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert wurde. Es werden 100 μ l Aliquots hergestellt, die entweder für die anschließende Elektroporation auf Eis aufbewahrt oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Die Elektroporation von *E. coli*-Zellen wurde nach Dower *et al.* durchgeführt [156]. Hierfür wurden 100 μ l der Zellsuspension elektrokompetenter *E. coli*-Zellen zu 1 μ l der DNA-Lösung gegeben und 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Elektroporation wurde in einem *E. coli*-Pulser (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Spannung betrug 1800 V. Direkt nach dem Puls wurden 900 μ l SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Schließlich wurden 150 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Agar Platten ein dem Resistenzgen der Plasmid-DNA entsprechendes Antibiotikum enthielt (70–100 μ g/ml Ampicilin oder 30–50 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Lagerung von *E. coli*-Klonen

Agarplatten, die Bakterienkolonien trugen wurden mit Parafilm verschlossen und konnten für einen Monat bei 4 °C gelagert werden. Flüssigkulturen konnten eine Woche bei 4 °C gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit 300 µl Glycerin versetzt und in einem Kryoröhrchen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Herstellung eines T-Überhanges an linearisierter Plasmid-DNA

Zur Herstellung einer Plasmid-DNA mit T-Überhang wurden 20 µg des Plasmides pZero-2 (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Restriktionsenzym Eco32I inkubiert. Anschließend wurden die in der Reaktionslösung enthaltenen Proteine durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt, die DNA durch Zugabe von Ethanol gefällt und in 50 µl H₂O aufgenommen. Jeweils 15 µl der DNA Lösung wurden mit 5 µl Standard PCR Puffer, 10 µl dTTP-Lösung (100 mM) und 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase versetzt und die Reaktion mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 70 °C wurde wiederum eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die DNA mit Ethanol gefällt und in 100 µl H₂O aufgenommen. Die erhaltene DNA-Lösung wurde für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Subklonierung von PCR Produkten mittels T-Überhang

Zur Subklonierung von PCR Produkten in Plasmid-DNA mit T-Überhang wurden PCR Ansätze, die nicht mit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt wurden, mit 1 Unit Taq-DNA-Polymerase versetzt und 20 min bei 70 °C inkubiert. PCR Ansätze die bereits Taq-DNA-Polymerase enthielten wurden direkt in der Ligation eingesetzt. Die Ligationsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl und enthielten 2 µl Plasmid-DNA Lösung (linearisiert mit T-Überhang), 3 µl PCR-Reaktionsansatz, 1 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl) und 3 µl H₂O. Der Ligationsansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet.

Kontrolle von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mittels PCR

Für die Kontrolle von Bakterienkulturen mittels PCR wurden 50 µl LB-Medium, welches mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer Bakterienkultur angeimpft. Nachdem die Lösung 1 h bei 37 °C geschüttelt wurde, wurde 1 µl der Kultur in einen PCR-Ansatz mit einem Volumen von 20 µl gegeben, der die Primer für die Kontrolle der Plasmid-DNA enthielt und dieser einem entsprechenden Temperaturprogramm ausgesetzt.

Gelfiltration von DNA

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelfiltration aus verschiedenen Reaktionsansätzen mit einem Volumen bis 50 µl wurden 1 ml-Zentrifugationssäulen (Micro Bio-Spin Chromatography Column, Bio-Rad, München) und Gelfiltrationsmatrix (Sephadex G-25, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. 1 ml der Matrix-Suspension wurde in eine Zentrifugationssäule gegeben und 30 s bei 70–100 xg und 90 s bei 400 xg zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Lösung mit den zu trennenden Komponenten, auf die Matrix gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 30 s bei 70–100 xg und 90 s bei 400 xg wurden Säule und Matrix verworfen und das Filtrat entsprechend weiterverwendet.

Silberfärbung von DNA-Banden in PAGE-Gelen

Die Gele wurden nach der Elektrophorese zwei Mal für 3 min in Fixierlösung (24 % (v/v) Ethanol, 32 mM p-Toluolsulfonsäure) inkubiert und anschließend für 30 min in Färbelösung (12 mM Silbernitrat, 4 mM p-Toluolsulfonsäure) eingelegt. Nachdem die Gele zwei Mal mit H₂O gewaschen wurden, wurden sie in Entwicklerlösung (24 mM Natriumcarbonat) inkubiert, bis die gewünschte Intensität der Banden erreicht war. Daraufhin wurde die Entwicklung durch Überführung der Gele in Stöplösung (50 mM EDTA) abgebrochen.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-nukleotid-Methode [157]. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep *Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert, gereinigt und photometrisch quantifiziert. Die Sequenzierungsreaktionen enthielten 500 ng

Plasmid-DNA, 10 pmol des entsprechenden Primers, 6 μl *Half Term*-Puffer und 2 μl *Big Dye Terminator Ready Reaktion Mix* und wurden mit ddH_2O auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt. Die für die Sequenzierung verwendeten Reagenzien waren Bestandteile des *Big Dye Terminator Ready Reaktion Kits* (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Sequenzierungsansätze wurden dem Temperaturprogramm das in Tabelle 3.3 aufgeführt ist, ausgesetzt.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	30 s	96 °C
2. Hybridisierung	5 s	48 °C–50 °C
3. Elongation	4 min	60 °C
25 Zyklen (Schritte 1–3)		
4. Terminale Elongation	5–10 min	72 °C

Tabelle 3.3 Temperaturprogramm für die DNA-Sequenzierung

Anschließend wurde die Reaktion mit ddH_2O auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt, mit 10 μl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 250 μl 96 %-igem Ethanol versetzt und zentrifugiert (25 min, 20.000xg, 18 °C). Nach Zugabe von 400 μl 70 %igem Ethanol wurde erneut 5 min bei 20.000 xg zentrifugiert, der Überstand entfernt und die DNA 30 min bei 37 °C getrocknet. Die Auftrennung der DNA und die Auswertung der Daten erfolgte im Institut für Zellbiochemie am Universitätskrankenhaus Eppendorf im Arbeitskreis Richter.

Aufnahme der Schmelzkurven von Oligonukleotiden

Die Aufnahme der Schmelzkurven von Oligonukleotiden erfolgte in einem Photometer mit temperierbarer Küvettenhalterung (Cary 50 UV-Vis spectrophotometer, Varian, Darmstadt). Die Konzentration der DNA-Lösung wurde in dem entsprechenden Puffer so eingestellt, dass die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) bei RT im Bereich von 0,5–0,8 lag. Die Lösung wurde in einer Quarzküvette vermessen, die mit einem Septum verschlossen wurde, um eine zu starke Volumenabnahme der Lösung durch Verdunstung beim Erwärmen der Küvette zu verhindern. Die Temperatur wurde von RT bis 65 °C in Schritten von 3–5 °C erhöht, wobei bei jeder Temperaturerhöhung die Konstanz der optischen Dichte vor der Messwerterfassung abgewartet wurde. Die erhaltenen Werte für die optischen Dichten wurden in einem Diagramm gegen die Temperatur aufgetragen.

Gefriertrocknung

Zur Erhöhung der Konzentration, zum Transport oder zur Lagerung wurden verschiedene in Lösung befindliche Komponenten, wie Nukleinsäuren, Nukleotide, PNA, Peptide, Proteine usw. gefriergetrocknet. In Abhängigkeit vom Volumen wurde die Gefriertrocknung in Glaskolben oder in Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von 0,5–50 ml durchgeführt, wobei die Deckel der jeweiligen Gefäße mehrfach durchstochen wurden. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und für einen Zeitraum von 1 h bis 3 d in eine Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode) gegeben.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Tris-Glycin-Gele)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt [158]. Die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 3.4 gezeigt. In einem Gießstand (Multi-Cast, Modell SE200, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) konnten simultan 5 Gele gegossen werden. Zunächst wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 5 cm gegossen und mit 500 µl Isopropanol pro Gel überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngel (ca. 1 h) wurde das Isopropanol abgegossen, der Gießstand mit der Sammelgellösung bis zum oberen Rand gefüllt und die Gele mit Kämmen versehen, um die Taschen für die Protein-Proben freizuhalten. Die Protein-Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Tankpuffer gefüllten Minigel-Elektrophoresekammer (Mighty Small, Amersham Biosciences, Freiburg) bei einem Strom von 20 mA pro Gel. Für die Zuordnung des Molekulargewichtes der Proteine wurde ein entsprechender Protein-Standard mit aufgetrennt.

Silberfärbung von Proteinbanden

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese für 1 h in 30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Eisessig fixiert und anschließend für 1–12 h in eine Inkubationslösung aus 500 mM Natriumacetat, 14 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 25 % (v/v) Ethanol und 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd (25 %ig) eingelegt. Nachdem drei

	10 %	12 %	15 %	3 %
	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Lsg (40 %)	7,5 ml	9 ml	11,25 ml	1,13 ml
Trenngelpuffer (4x)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	-	-	3,75 ml
ddH ₂ O	14,9 ml	13,5 ml	11,1 ml	10 ml
APS (10 %)	90 μ l	90 μ l	90 μ l	60 μ l
TEMED	24 μ l	24 μ l	24 μ l	12 μ l

Tabelle 3.4 Zusammensetzung der Gele für eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.

mal 10 min mit H₂O gewaschen wurde, wurden die Gele 30 min in 6 mM AgNO₃, 0,06 % (v/v) Formaldehyd (37 %ig) gefärbt, kurz mit Wasser gewaschen und anschließend in 263 mM Na₂CO₃, 0,06 % (v/v) Formaldehyd (37 %ig) entwickelt. Gestoppt wurde die Entwicklung durch Überführen der Gele in 50 mM EDTA-Lösung.

Coomassie Färbung von Proteinbanden

Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für 30 min in einer filtrierten Lösung mit 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig gefärbt. Als Entfärber diente eine Lösung aus 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig.

Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien in einem SE 1200 Easy Breeze Air Gel Dryer (Hofer Scientific Instruments, USA) getrocknet.

Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Eine Kultur mit LB-Medium und einem Volumen von 3 ml wurde mit einer Kolonie des entsprechenden Klones angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum und gegebenenfalls 0,1 % Glucose inokuliert und die Zellen bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=1 kultiviert. Daraufhin wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM die Expression induziert und die Kultur 3 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Zur Aufreinigung cytoplasmatisch rekombinant exprimierter Proteine wurden die *E. coli*-Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Bakterienkulturen nach Beendigung der Expression zunächst 15 min bei 1.700 xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in einem Puffer resuspendiert, der für anschließende Reinigungsschritte verwendet wurde. Die Zellsuspension wurde auf Eis gelagert und bei 12.000 microns 15 mal 30 s sonifiziert (Soniprep 150, MSE Hamburg). Die Suspension wurde anschließend 20 min bei 20.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden durch einen Spritzenfilter (0,22 µm, Typ GS, Millipore, Eschborn) filtriert und bis zu weiteren Reinigungsschritten bei 4 °C gelagert.

Säulenchromatographische Reinigung von Proteinen

Alle säulenchromatographischen Reinigungsverfahren für Proteine wurden automatisiert bei 4 °C an einer FPLC-Anlage (ÄKTA purifier, Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt, die über einen Fraktionssammler (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verfügte. Die FPLC-Anlage und die entsprechenden Säulen wurden zunächst mit ddH₂O und anschließend mit dem verwendeten Trennpuffer gespült. Alle Puffer und proteinhaltigen Fraktionen wurden vor der Benutzung durch einen 0,22 µm Filter (Typ GS, Millipore, Eschborn) filtriert. Alle Messdaten, wie Absorption bei 280 nm und Leitfähigkeit der Lösung, wurden während des gesamten Laufes aufgezeichnet. In dieser Arbeit wurden ionenaustausch- sowie affinitätschromatografische Methoden angewendet.

IMAC (*Immobilized Metallion Affinity Chromatography*)

Rekombinante Fusionsproteine mit einem Histidin-Hexamer („His-Tag“) wurden mittels einer Ni-NTA-Matrix gereinigt. Hierzu wurde das Zellysate auf eine Ni-NTA-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml aufgetragen und die Säule mit 4 ml *Sonication* Puffer gespült. Unspezifisch gebundene Proteine wurden anschließend mit 4 ml *Sonication*-Puffer mit 20 mM Imidazol von der Säule entfernt. Die Elution der über ein Histidin-Hexamer gebundenen Proteine erfolgte mit *Sonication*-Puffer der Imidazol in einer Konzentration von 250 mM enthielt.

Bestimmung der DHFR-Aktivität

Dihydrofolatreduktase katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat (FH₂) zu Tetrahydrofolat (FH₄), wobei NADPH zu NADP⁺ umgesetzt wird. Die Aktivität der DHFR kann durch den Verbrauch von NADPH im Testansatz ermittelt werden, indem die NADPH-Konzentration photometrisch bei 340 nm bestimmt wird [159]. Die Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Ansatz	Reagenz
Kontrolle	330 µl Test-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5) 500 µl ddH ₂ O 70 µl NADPH (100 µM) in Test-Puffer 100 µl FH ₂ (75 µM) in Test-Puffer
Probe	330 µl Test-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5) 400 µl ddH ₂ O 100 µl Probe 70 µl NADPH (100 µM) in Test-Puffer 100 µl FH ₂ (75 µM) in Test-Puffer

Tabelle 3.5 Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze für den DHFR-Aktivitätstests.

Die Komponenten der Kontroll- und Reaktionsansätze wurden, mit Ausnahme von FH₂, in eine Einmalküvette gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von FH₂ gestartet und die optische Dichte bei 340 nm vermessen ($E_{t=0}$). Als Referenzwert diente Test-Puffer:H₂O (1:1). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde erneut die Absorption vermessen ($E_{t=30}$). Zur Berechnung der Probenaktivität wurde zunächst die Differenz (ΔE) der Absorption zum Zeitpunkt $t=0$ min ($E_{t=0}$) und $t=30$ min ($E_{t=30}$) gebildet. Von diesen Werten wurde der entsprechende Wert der Kontrolle abgezogen. Aus den korrigierten Absorptionsdifferenzen (ΔE_{korrr}) kann mit Hilfe des molaren Absorptionskoeffizienten für NADPH ($\varepsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die verbrauchte NADPH-Menge und unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Umsetzung weiterhin die Aktivität in Einheiten (*Units*) errechnet werden. Eine *Unit* entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro Minute 1 mmol FH₂ in FH₄ umwandelt.

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen erfolgte mittels der BCA-Proteinbestimmung [160]. Diese beruht auf der Einfärbung von Proteinen durch Cu^{2+} -Ionen, die durch Bicinchoninsäure verstärkt wird. Als Standard wurde BSA verwendet. Zur Bestimmung wurde ein Teil der proteinhaltigen Lösung mit dem 20-fachen Volumen BCA-Lösung C versetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden die Proben bei 562 nm im Photometer (BioMate3, Thermo Spectronic, Rochester, USA) vermessen. Mit Hilfe einer erstellten BSA-Eichgerade konnte die jeweilige Proteinkonzentration aus den erhaltenen Werten der Absorption bestimmt werden.

Immobilisierung von Proteinen auf Mikropartikeln mit Carboxyoberflächen

Zur Aktivierung der Carboxygruppen wurden 20 μl einer Lösung aus 31 mM EDC; 100 mM NHS; 0.5 M MES- Na_2CO_3 (pH 6,3) zu 100 μl einer Partikelsuspension (nanomag-D 250, Micromod, Rostock) gegeben und die Suspension unter Schütteln 1 h bei RT inkubiert. Die Partikel wurden zwei mal mit 0.1 M MES- Na_2CO_3 -Puffer (pH 6,3) gewaschen und in 100 μl 0.1 M MES- Na_2CO_3 -Puffer (pH 6,3) suspendiert, der das zu immobilisierende Protein enthielt. Nachdem die Reaktionsmischung 3 h RT bei geschüttelt wurde, wurden 10 μl 25 mM Glycin in H_2O zugegeben. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation bei RT, wurden die Partikel gewaschen und bei 4 °C gelagert.

3.3 Trennungs- und Analysemethoden

Kapillarelektrophoretische Trennung

Die kapillarelektrophoretischen Trennungen wurden mit dem Kapillarelektrophorese-System 270A von Applied Biosystems (Langen) durchgeführt. Die Datenaquisition erfolgte digital mit dem 24Bit-AD-Wandler-Modul LTC2400 von Linear Technology (Ismaning). Durch einen Luftstrom konnten die Trennkapillaren über einen Bereich von Raumtemperatur bis 50 °C temperiert werden. Üblicherweise betrug die Temperatur der Kapillare ca. 30–35 °C, soweit nicht höhere Temperaturen, z.B. für die Denaturierung von Nukleinsäuren notwendig waren. Bei den Trennungen kamen sowohl unbeschichtete, als auch an der Innenwand mit verschiedenen Polymeren belegte Quarzkapillaren zum

Einsatz, die gegebenenfalls auch mit diversen viskosen Medien oder vernetztem Polyacrylamid gefüllt sein konnten. Diese hatten eine totale Länge von 30–100 cm, wobei die effektive Länge (von der Probenaufgabe bis zum Detektor) ca. 10–80 cm betrug. Die angelegte Trennungsspannung konnte über einen Bereich von 100–30.000 Volt mit unterschiedlichen Polaritäten variiert werden. Die Detektion erfolgte durch einen Absorptionsdetektor in einem Wellenlängenbereich von 200–600 nm. Dafür wurde mit heißer konzentrierter Schwefelsäure ein Detektionsfenster von ca. 5 mm Länge in die Polyimidschicht geätzt, die die Kapillare umschloss. Für die Probenaufgabe auf die Trennkapillare wurde bei Benutzung von niedrig viskosen Trennpuffern vorwiegend die hydrodynamische Injection angewandt, wobei die Probe in einen Zeitraum von 5–20 s mit einem konstanten Unterdruck in die Kapillare gesaugt wurde. Bei der Verwendung von gelgefüllten Kapillaren oder von viskosen Trennpuffern wurden die Proben elektrokinetisch injiziert, wobei eine Spannung von 5 kV mit einer entsprechenden Polarität für einen Zeitraum von 5–30 s angelegt wurde. Die Trennung erfolgte über einen Zeitraum von 10–30 min. Der pH-Wert der verwendeten Puffer lag bei unbeschichteten Kapillaren im Bereich von 1–9 und bei beschichteten Kapillaren zwischen 2 und 8, um die Stabilität der Polymerschicht zu gewährleisten. Bei den verwendeten Puffern handelte es sich vorwiegend um Phosphat-, Tris-, Borat- oder Acetat-Puffer.

Kapillarelektrophoretische Trennung mit unbeschichteten Kapillaren

Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung mit unbeschichteten Kapillaren war ein elektroosmotischer Fluss (EOF) in der Kapillare vorhanden. Der Durchmesser der Kapillaren lag dabei zwischen 20–100 μm . Die Polarität der Trennungsspannung wurde so gewählt, dass die Kathode detektorseitig lag. Als Referenzsubstanz, wurde Mesityloxid in einer Verdünnung von 0,2 % (v/v) verwendet, welches als ungeladenes Molekül mit der Geschwindigkeit des EOF durch die Kapillare migrierte. Die Kapillaren wurden vor der Benutzung 10 min mit 1 M NaOH-Lösung gespült und 20 min mit Trennpuffer äquilibriert. Zwischen den Trennungsläufen wurden die Kapillaren 2 min mit 0,1 M NaOH-Lösung und 5–7 min mit Trennpuffer gespült. Die Trennungsspannungen betragen 15–30 kV.

Belegung von Kapillaren mit Polyacrylamid

Zur Belegung von Quarzkapillaren mit Polyacrylamid [143], wurden die Kapillaren auf die gewünschte Länge geschnitten und 10 min mit einer 1 M NaOH-Lösung gespült. Der Lösungsfluss, wurde gestoppt und die Lösung

weitere 6 h bei Raumtemperatur in der Kapillare belassen. Anschließend wurde die Kapillare nacheinander jeweils 5 min mit 0.1 M Salzsäure und 0.1 M NaOH-Lösung gespült und jeweils 30 min bei Raumtemperatur ohne Lösungsmittelfluss inkubiert. Nachdem jeweils 5 min mit H₂O und Aceton gespült wurde, wurde die Kapillare mit einer 1:1 (v/v) Mischung aus Aceton und 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate (Bindesilan) gefüllt und über Nacht inkubiert. Nachdem jeweils 15 min mit Methanol und H₂O gespült wurde, wurde die Kapillare mit der entgasten Polymerisationslösung (6 % (w/v) Acrylamid; 100 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA; pH 8,2; 2 µl/ml TEMED; 4 µl/ml 10 % (w/v) APS) gefüllt. Nach 12 h Polymerisation wurden die Kapillaren 20 min mit H₂O gespült [146].

Belegung von Kapillaren mit Polyvinylalkohol (PVA)

Die Belegung von Quarzkapillaren mit Polyvinylalkohol wurde nach Karger *et al.* durchgeführt [146]. Die Kapillare wurde dabei auf 110 °C temperiert, 2 h mit konz. Salzsäure:H₂O (1:1) und anschließend mit H₂O gespült. Eine Mischung aus 1 ml Trimethoxyvinylsilan und 200 µl 0.1 M Salzsäure wurde 1 h bei RT inkubiert und in die Kapillare gegeben. Nach 15 h Inkubation bei RT wurde mit Methanol gespült und die Kapillare unter einem leichten Argon-Fluss 2 h bei 110 °C inkubiert. Zu einer Mischung aus 750 µl Ethylacetat und 500 µl Vinylacetat wurden 25 µl 5 % (w,v) Dibenzoylperoxid in Ethylacetat gegeben. Die Kapillare wurde mit der Reaktionslösung unter einem Überdruck von 4–5 bar gefüllt, die Enden verschlossen und 20 h bei 75 °C inkubiert. Die Reaktionslösung wurde entfernt und die Kapillare mit Ethylacetat und Methanol gespült. Eine Lösung von 0.5 M Natriummethanolat in Methanol wurde langsam für 15 min bei RT durch die Kapillare gepumpt. Anschließend wurde mit Methanol gespült.

Kapillarelektrophoretische Trennung mit beschichteten Kapillaren

Um den EOF zu eliminieren, wurden Kapillaren verwendet, die mit Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol belegt waren. Diese hatten einen Durchmesser von 50–100 µm. Für die Trennung von Nukleinsäuren lag die Anode dabei detektorseitig. Die Kapillaren wurden vor der Benutzung 20 min mit Trennpuffer äquilibriert. Zwischen den Trennungsläufen wurde 5 min mit dem jeweiligen Trennpuffer gespült.

Kapillar-Gelelektrophorese (CGE)

Die Kapillar-Gelelektrophorese wurde für die Auftrennung von kurzen DNA Fragmenten verwendet. Dazu wurden polyacrylamid-beschichtete Kapillaren mit einem Durchmesser von 100–250 μm und einer totalen Länge von 20–40 cm mit Polyacrylamid gefüllt [147,161]. Es wurde eine 4–8%ige Acrylamid : Bisacrylamid-Lösung (29:1) (gegebenenfalls mit 8 M Harnstoff) in TBE-Puffer in einem Ultraschallbad bei einem Unterdruck von 100–150 mbar 3 h bei RT entgast. Anschließend wurde 1 $\mu\text{l/ml}$ einer 10%igen APS-Lösung zugegeben, die Lösung mit einem leichten Unterdruck in die Kapillare gesaugt und die Kapillare 15 h bei RT bis zur vollständigen Polymerisation gelagert, wobei die Enden der Kapillare in der Acrylamid-Lösung belassen wurden. Um Nebenprodukte der Polymerisationsreaktion und überschüssiges APS zu entfernen, wurden die gefüllten Kapillaren vor der Benutzung 2–4 h bei einer Spannung von 5–10 kV bis zu einer konstanten Absorption bei 200 nm äquilibriert. Die Probenaufgabe erfolgte bei der Kapillar-Gelelektrophorese elektrokinetisch durch das Anlegen einer Spannung von 5 kV mit einer entsprechenden Polarität für einen Zeitraum von 5–30 s. Die Trennungsspannung über die gesamte Kapillare betrug in Abhängigkeit des Durchmessers der Kapillare 5–15 kV um einen zu hohen Stromfluss und damit eine Überhitzung der Kapillare zu verhindern.

Kapillarelektrophorese mit viskosen Puffern

Alternativ zur CGE wurden kapillarelektrophoretische Trennungen unter Verwendung von viskosen Puffern durchgeführt. Die Vorteile des *non gel sieving* bestehen in der Möglichkeit, das Trennmedium in der Kapillare zu erneuern, was bei der Verwendung von vernetzten Gelen nicht möglich ist. Die totale Länge der verwendeten Kapillaren, die entweder mit Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol belegt waren, betrug 20–50 cm. Die Zusammensetzung der Trennpuffer entsprach dabei der, bei der kapillarelektrophoretischen Trennung mit beschichteten Kapillaren. Die Erhöhung der Viskosität wurde dabei durch Zusatz von 0,5–2% Methyl-Cellulose [162], 0,5–2% Hydroxyethyl-Cellulose [163] oder 4–12% linearem Polyacrylamid [143,164] zu den Puffern erreicht. Die Puffer wurden je nach Viskosität mittels Unterdruck in die Kapillaren gesaugt, oder bei höheren Viskositäten mit einem Druck von bis zu 200 bar in die Kapillaren gepresst. Die hierfür verwendete Vorrichtung ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Probenaufgabe erfolgte elektrokinetisch durch das Anlegen einer Spannung von 5 kV mit einer entsprechenden Polarität für einen Zeitraum von 5–30 s. Die Trennungsspannung über die gesamte Kapillare betrug in Abhängigkeit des Durchmessers der Kapillare 5–15 kV, um einen zu hohen Stromfluss und damit eine Überhitzung der Kapillare zu verhindern.

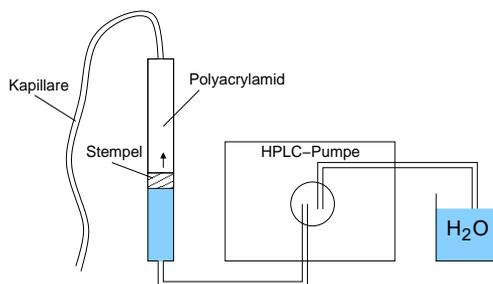


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Apparatur für die Füllung von Kapillaren mit hoch viskosen Puffern. Der Puffer befand sich in einem Stahlrohr und wurde durch den von einer HPLC-Pumpe erzeugten Wasserdruck in die Kapillaren gepresst.

Micellare elektrokinetische Chromatographie

Bei der micellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) wurden unbeschichtete Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 20–100 μm und einer totalen Länge von 50–90 cm verwendet. Bei den verwendeten Trennpuffern handelte es sich um Phosphat-, Tris- oder Borat-Puffer. Die Puffer enthielten zudem SDS in Konzentrationen von 50–100 mM [148]. Die Probenaufgabe erfolgte bei der MEKC hydrodynamisch oder elektrokinetisch. Die Trennungsspannung über die gesamte Kapillare betrug 15–30 kV.

Chromatografische Methoden

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Trennung von Stoffgemischen mittels HPLC stand eine HPLC-Anlage der Firma Dionex (Idstein) zur Verfügung. Diese bestand aus einer Gradientenpumpe für bis zu vier Lösungsmitteln (Dionex P580), einem UV-Vis-Detektor (Dionex UVD 340S) und der Software Chromeleon (Dionex, Version 6.4). Es wurden Säulen mit einer Länge von 25 cm und Innendurchmessern von 4,6–22 mm verwendet, die mit unpolaren Trennmatrices (*reverse phase*) gefüllt waren (C4-, C8-, C18-Säulen). Diese sind in Tabelle 2.1 auf Seite 29 aufgelistet. Vor den Trennungsläufen wurden die Säulen mit bis zu einer Konstanz der Absorption bei 225 nm isokratisch mit der Startlösungsmittelzusammensetzung äquilibriert. Zur Auftrennung wurde die Probe mit Hilfe eines Injektors in den konstanten Lösungsmittelfluss injiziert. Die

Methoden

Probenbestandteile wurden schrittweise durch Erhöhung der unpolaren Lösungsmittelkomponente von der Säule eluiert. Die Lösungsmittelzusammensetzung wurde linear oder sprunghaft verändert. Hinter der Säule wurden die Komponenten absorptiv detektiert und gegebenenfalls fraktioniert.

Zunächst wurden die Trennungen in einem analytischen Maßstab durchgeführt, wobei Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm zum Einsatz kamen. Die Flußrate der mobilen Phasen betrug 1–1,5 ml/min und wurde so justiert, dass der generierte Gegendruck an der HPLC-Pumpe in einem Bereich von 40–130 bar lag. Das injizierte Probenvolumen betrug 5–50 µl. Nach der Etablierung geeigneter Trennungsbedingungen erfolgte gegebenenfalls eine Trennung im präparativen Maßstab, wobei die Innendurchmesser der Säulen bis zu 22 mm betragen. Die Flussraten der mobilen Phasen betragen in Abhängigkeit der Säulendurchmesser und der verwendeten Lösungsmittel 2–10 ml/min, wobei für eine effektive Trennung der Gegendruck an der Pumpe zwischen 30 und 130 bar liegen sollte. Die Volumina der injizierten Proben betragen 50–1000 µl.

Bei den verwendeten mobilen Phasen handelte es sich um Acetonitril als unpolare bzw. eluierende Komponente und Wasser bzw. einem Puffer aus flüchtigen Komponenten, um eine Wiedergewinnung der Substanzen aus aufgefangenen Fraktionen durch Gefriertrocknung zu gewährleisten. Die verwendeten mobilen Phasen sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Pufferkomponenten in einer Konzentration von 0,1 M eingesetzt.

Phase A	Phase B	pH-Bereich
H ₂ O + 0,1 % TFA	Acetonitril + 0,1 % TFA	pH 2
Triethylammonium-phosphat	Acetonitril	pH 2
Ammonium-trifluoracetat	Acetonitril	pH 5–6,5
Triethylammonium-formiat	Acetonitril	pH 6
Ammonium-acetat	Acetonitril	pH 6,5–7,5
Triethylammonium-acetat	Acetonitril	pH 7
Triethylammonium-bicarbonat	Acetonitril	pH 8,5

Tabelle 3.6 Verschiedene flüchtige mobile Phasen für die HPLC-Trennung.

Nanoliter-HPLC

Für die HPLC-Trennung im Mikro-Maßstab stand ein Nano-HPLC-System (Shimadzu, Duisburg) zur Verfügung. Die Säule mit einem Innendurchmesser

von 1 mm und einer Länge von 10 cm war mit einer C18-Matrix gefüllt. Die mobilen Phasen waren 0,1 M Triethylammonium-acetat und Acetonitril. Die Flussrate betrug 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ und wurde über einen Lösungsmittel-Splitter und eine entsprechende Steuerkapillare geregelt. Die Injektion der Probe mit einem Volumen von 5 μl wurde manuell durchgeführt. Die Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Analytische Methoden

MALDI-TOF

Die Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy*, MALDI-TOF MS) wurde zur Bestimmung der Molekulargewichte von Oligonukleotiden und Peptid Nukleinsäuren eingesetzt. Hierzu wurde jeweils 1 μl der entsprechenden gelösten Substanz mit einer Konzentration von 1 μM in H_2O mit einer niedermolekularen Matrix (Zimtsäure- oder Benzoessäurederivate) kokristallisiert. Im Massenspektrometer (Biflex III Spektrometer, Bruker, Billerica, USA) wurden die kristallinen Oberflächen durch einen Puls kurzweiliger Strahlung eines N_2 -Lasers angeregt, so dass geladene Matrix- und Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt wurden. Dabei ist die Anregung der inneren Freiheitsgrade der beteiligten Moleküle so gering, dass sogar thermisch labile Makro-moleküle, wie z.B. Proteine, diesen Prozess intakt überstehen. Im Hochvakuum des linearen Flugrohres wurden die Ionen anschließend durch ein elektrostatisches Feld auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt und die Flugzeit bis zum Auftreffen auf den Detektor ermittelt. Aus der Kenntnis der Beschleunigungsspannung und der Flugstrecke konnte das Verhältnis von Masse und Ladung (m/z) der entsprechenden Ionen errechnet und somit das Molekulargewicht bestimmt werden

4 Ergebnisse

4.1 Selektion von PNA-Molekülen

Für die Selektion von PNA-Molekülen mit Bindungseigenschaften für ein Zielmolekül aus einer Bibliothek war eine Methode notwendig, die es erlaubte, die selektierten PNA/Zielmolekül-Komplexe von den nicht bindenden PNA-Molekülen der Bibliothek abzutrennen. Hierfür wurden zunächst Verfahren getestet, die die Immobilisierung des Zielmoleküls an einer festen Phase vorsahen und nicht gebundene PNA durch Waschen entfernt werden sollte. Zusätzlich wurden chromatografische und elektrophoretische Methoden auf ihre Eignung hin untersucht freie PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexe zu trennen.

Als Modellsystem wurde eine randomisierte PNA aus 18 Monomeren verwendet, an deren N-Terminus ein Biotinrest angefügt war. Als Zielmolekül im Modellsystem diente die thermostabile Dihydrofolatreduktase aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus catenulatus* [165]. Durch die ausserordentliche Stabilität dieses Proteins wurde die Möglichkeit einer Degradierung des Zielmoleküls während der Selektionsexperimente, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden sollten, minimiert. Weiterhin war durch die Verwendung von kompetitiven Inhibitoren der DHFR die selektive Elution von bindender PNA aus dem aktiven Zentrum des Enzyms möglich. Gleichermaßen konnte die Bindung dieser Liganden durch einen etablierten Aktivitäts-Test der DHFR evaluiert werden.

Da für die Etablierung des Modellsystems ausreichende Mengen des Zielmoleküls benötigt wurden, sollte zunächst die Expression der thermostabilen Dihydrofolatreduktase und deren Aufreinigung durchgeführt werden. Diese wurde dann in entsprechenden Immobilisierungs- und Trennungsexperimenten eingesetzt. Als Zielmolekül für weiterführende Selektionsexperimente, wurde aufgrund einer höheren therapeutischen Relevanz die humane Dihydrofolatreduktase gewählt. Diese wurde in ein entsprechendes Expressions-Plasmid subkloniert und die Expression evaluiert.

4.1.1 Expression des Zielmoleküls

Zur Produktion der thermostabilen Dihydrofolatreduktase sollte *E. coli* als prokaryotisches Expressionssystem genutzt werden, da dieses im Gegensatz zu einem eukaryotischen System leichter zu handhaben war und größere Proteinmengen hergestellt werden konnten. Das bakterielle Expressions-Plasmid pET26-DHFR-His, das die cDNA der thermostabilen DHFR enthielt, stand

in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Auch die cDNA der humanen DHFR stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurde vor der Expression in das bakteriellen Expressions-Plasmid pET26b(+) kloniert.

4.1.1.1 Expression und Reinigung thermostabiler Dihydrofolatreduktase

Bei der thermostabilen Dihydrofolatreduktase handelte es sich um ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen Histidin Hexamer (*His-Tag*), das zur leichteren Aufreinigung dienen sollte. Zur Expression wurden *E. coli* BL21-(DE3) Zellen verwendet, die zuvor mit dem Expressionsvektor pET26-DHFR-His transformiert wurden. Das Protein wurde anschließend mittels Ni-Affinitäts-Chromatografie und einer anschließenden Kationenaustausch-Chromatografie gereinigt. In der Analyse der Elutionsfraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE erschien die DHFR als singuläre Bande ohne erkennbare Verunreinigungen (Abbildung 4.1). Die Fraktionen wurden vereinigt und vor der weiteren Verwendung gegen Sonifizierungs-Puffer dialysiert.

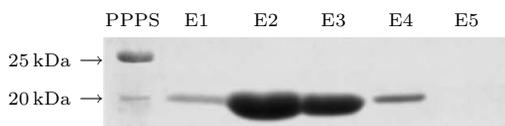


Abbildung 4.1 Analyse der Elutionsfraktionen nach der säulenchromatographischen Reinigung der DHFR. Die eluierten proteinhaltigen Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 15% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Weitere Informationen zur Durchführung befinden sich im Anhang auf Seite 189. **E1–E5**: Elutionsfraktionen; **PPPS**: *precision plus protein standard*

Aktivitätsassay für thermostabile DHFR

Um die Qualität der hergestellten Dihydrofolatreduktase zu überprüfen wurde ein Aktivitäts-Test durchgeführt. Dieser erfolgte gemäß der Beschreibung auf Seite 54 mit den vereinigten und dialysierten Elutions-Fraktionen. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 4.2 dargestellt.

4.1.1.2 Klonierung und Expression humaner DHFR

Für die Expression der humanen DHFR sollte ebenfalls das bakterielle Expressions-Plasmid pET26b(+) verwendet werden. Die cDNA der humanen

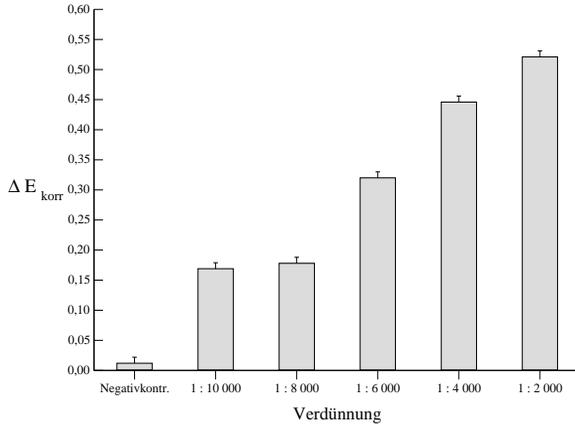


Abbildung 4.2 Grafische Darstellung der Absorptionsdifferenzen für den DHFR-Aktivitätstest der thermostabilen Dihydrofolatreduktase. Der Aktivitätstest wurde gemäß der Beschreibung auf Seite 54 mit den vereinigten und dialysierten Elutions-Fractionen aus Abbildung 4.1 durchgeführt. Die Lösung enthielt 4 mg/ml DHFR. Als Negativkontrolle diente eine Ansatz ohne DHFR.

DHFR war in der Arbeitsgruppe in dem Plasmid pET11 vorhanden. Diese wurde mit den Oligonukleotiden dhfrndefor und dhfrhindback amplifiziert, die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen enthielten. Das PCR-Produkt wurde mit den Nukleasen NdeI und HindIII inkubiert und in den analog behandelten und dephosphorylierten Vektor pET26b(+) inseriert. Die Richtigkeit der Sequenz der eingefügten DNA wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Produktion der humanen DHFR erfolgte in BL21(DE3)-Zellen und wurde mittels SDS-PAGE evaluiert (Abbildung 4.3).

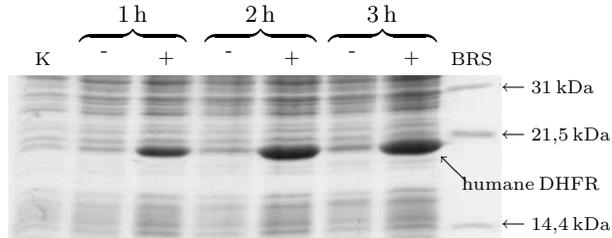


Abbildung 4.3 Kontrolle der Expression der humanen DHFR (Pfeil) in *E. coli*-BL21-Zellen. Die Durchführung ist im Anhang auf Seite 189 beschrieben. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE in einem 15%igen Gel. **K**: Kontrolle mit nicht transformierten Zellen nach 3 h; **BRS**: broad range standard

4.1.2 Immobilisierung thermostabiler DHFR

Eine Möglichkeit zur Abtrennung von nicht bindenden Molekülen bei einer Selektion bestand in der Immobilisierung des Zielmoleküls an einer festen Phase. Daher war es notwendig, die DHFR an geeigneten Oberflächen zu koppeln. Hierfür standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Da die thermostabile DHFR mit einem C-terminalen Histidin Hexamer versehen war, konnte über diesen eine koordinative Immobilisierung an einer Ni-NTA-Oberfläche stattfinden. Weiterhin wurde eine kovalente Immobilisierung des Enzyms an magnetischen Mikropartikeln durchgeführt. Da die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums auch nach der Immobilisierung des Enzyms ausschlaggebend für eine Selektion von Bindern ist, die in der Lage sind, das Enzym zu inhibieren, wurde die Aktivität des immobilisierten Enzyms durch einen DHFR-Aktivitäts-Test nachgewiesen.

Immobilisierung von DHFR an Ni-NTA-Strips

Die Immobilisierung über Ni-NTA Oberflächen erfolgte mit Ni-NTA HisSorb-Strips. Hierzu wurde die Proteinlösung in verschiedenen Verdünnungen in die Vertiefungen der Strips gegeben und inkubiert. Die Proteinlösung wurde entfernt und die Vertiefungen gewaschen. Der Aktivitätstest erfolgte, wie in Kapitel 3.2 auf Seite 54 beschrieben. Die Ansatzgröße wurde jedoch dem Volumen der Vertiefungen angepasst. Anhand der Absorptionsdifferenzen, die in Abbildung 4.4 dargestellt sind, ist ersichtlich, dass der Substratumsatz von der Verdünnung der Enzymlösung abhängig ist, die in den Ni-NTA HisSorb-Strips inkubiert wurde. Dass die thermostabile DHFR auch in immobilisiertem Zustand eine Aktivität aufweist, belegt, dass das aktive Zentrum des Enzyms auch nach einer Immobilisierung an Ni-NTA Oberflächen zugänglich ist.

Immobilisierung von DHFR auf magnetischen Mikropartikeln mit Carboxyoberflächen

Die kovalente Immobilisierung thermostabiler DHFR erfolgte an Carboxy-Oberflächen auf Magnetpartikeln. Zur Bestimmung der Aktivität immobilisierter DHFR auf Mikropartikeln mit Carboxyoberflächen, wurde die Aktivität der Partikelsuspension in verschiedenen Verdünnungen vermessen. Die Differenzen der Absorptionen sind in Abbildung 4.5 dargestellt und zeigen einen deutlichen Substratumsatz, der von der Menge der Partikelsuspension im Ansatz abhängig ist. Auch bei einer kovalenten Immobilisierung der DHFR, war das aktive Zentrum des Enzyms zugänglich.

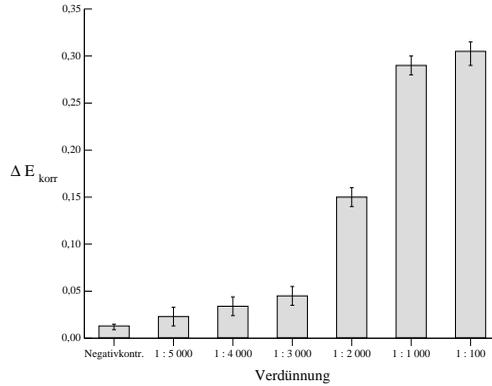


Abbildung 4.4 Darstellung der Absorptionsdifferenzen bei einem DHFR-Aktivitäts-Test mit immobilisierter thermostabiler DHFR an Ni-NTA HisSorb Strips (Qiagen, Hilden). Die DHFR wurde koordinativ immobilisiert. Die Durchführung der Immobilisierung und des Aktivitäts-Tests sind auf Seite 189 beschrieben.

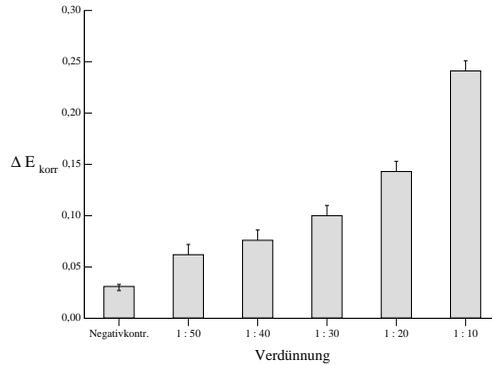


Abbildung 4.5 Darstellung der Absorptionsdifferenzen für den DHFR-Aktivitäts-Test mit kovalent immobilisierter thermostabiler DHFR an magnetischen Mikropartikeln mit Carboxyoberflächen. Die Durchführung des Aktivitäts-Tests ist auf Seite 190 beschrieben.

Immobilisierung an MTX-Agarose

Eine weitere Methode zur Immobilisierung von DHFR bestand in einer Affinitätskopplung an MTX-Agarose. MTX (Methotrexat) ist ein kompetitiver Inhibitor der DHFR, der eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2.1 \times 10^{-10} \text{ M}$ zur humanen DHFR aufweist. Nach einer Kopplung der DHFR durch dieses Verfahren war daher das aktive Zentrum blockiert und keine enzymatische

Ergebnisse

Aktivität mehr gegeben. Die so immobilisierte DHFR konnte jedoch für die Selektion von PNA-Molekülen, die an anderen Epitopen binden, eingesetzt werden. Ebenfalls konnte eine Vor-Selektion an der so immobilisierten DHFR stattfinden, um PNA, die nicht im aktiven Zentrum der DHFR bindet im Vorfeld einer Haupt-Selektion zu entfernen. Da die enzymatische Aktivität nicht mehr für die Überprüfung der DHFR-Präsenz an der festen Phase genutzt werden konnte, wurde diese durch die Bestimmung der Protein-Menge in der Kopplungs-Reaktion evaluiert, die im Laufe der Immobilisierung abnahm. Dazu wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus der Reaktion entnommen und in einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4.6).

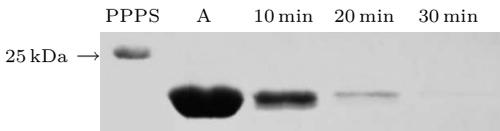


Abbildung 4.6 Überprüfung der Kopplungseffizienz thermostabiler DHFR an MTX-Agarose. Es wurden 500 μ l MTX-Agarosesuspension zu 500 μ l einer DHFR-Lösung (4 mg/ml) in Sonifizierungs-Puffer gegeben und 30 min bei RT geschüttelt. Um die Bindung von DHFR an die Matrix zu verfolgen, wurden in Abständen von 10 min je 10 μ l der Reaktionslösung entnommen und von der MTX-Matrix separiert, indem 1 min bei 25.000 xg zentrifugiert wurde. Die Auftrennung von jeweils 3 μ l der Zentrifugate erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel, das anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen wurde. **Bahn A:** DHFR-Lösung; **PPPS:** *precision plus protein standard*

4.1.3 Trennung von PNA und DHFR in Lösung

Eine alternative Möglichkeit zur Abtrennung nicht bindender PNA-Moleküle durch Immobilisierung des Zielmoleküls ist eine chromatografische Trennung der PNA/Zielmolekül-Komplexe von freien PNA-Molekülen der Bibliothek. Die Trennung von DHFR und freier randomisierter 18mer PNA konnte sowohl mittels HPLC als auch mittels Kapillarelektrophorese evaluiert werden. Voraussetzung für eine Selektion durch Einsatz dieser Methoden ist zum einen die Möglichkeit, zu fraktionieren und zum anderen eine hinreichend effektive und reproduzierbare Trennung, da die Komplexe aus Ligand und Zielmolekül in einer nicht detektierbaren Menge vorliegen und lediglich anhand der Retentionszeit abgefangen werden müssen.

4.1.3.1 Trennung von PNA und DHFR mittels HPLC

Für die Trennung von thermostabiler DHFR und freier PNA mittels HPLC wurden die Standardbedingungen der HPLC-Trennung modifiziert, um ein

Milieu zu gewährleisten, in dem das Zielmolekül nicht denaturiert vorliegt. Es wurden daher für die mobilen Phasen 0,1 M Triethylammoniumacetat Puffer mit einem pH-Wert von 7, sowie Acetonitril ohne jegliche Zusätze gewählt. Da die Ansätze in einem Selektions-Verfahren Volumina von einigen Mikrolitern haben, wurde die Trennung mit einer Flussrate von 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ evaluiert. Das Enzym eluierte bei 10 % Acetonitril bereits nach 1,5 bis 4,5 min von der Säule, was aus den Chromatogrammen in Abbildung 4.7 ersichtlich ist. PNA eluierte bei diesen Bedingungen in einem isokratischen Trennungslauf in einem Zeitraum von 40 min nicht (Daten nicht gezeigt), sondern konnte durch einen Sprung auf 90 % Acetonitril im Laufmittel von der Säule eluiert werden. Ein derartiger Sprung der Laufmittelzusammensetzung eluierte ebenfalls weitere hydrophobe Anteile in der Probe, die an der Säule gebunden waren, was das Signal bei Abwesenheit von PNA erklärt (in Abbildung 4.7 schwarz dargestellt). Das Laufverhalten von PNA/Protein-Komplexen in einer chromatografischen Trennung konnte nicht gezeigt werden, da eine an DHFR bindende PNA nicht zur Verfügung stand. Unter der Voraussetzung, dass eine gebundene PNA die Retention der DHFR nicht extrem verzögert, steht mit diesem Verfahren eine effiziente Trennungsmöglichkeit von PNA und Ligand/Zielmolekül-Komplexen zur Verfügung.

4.1.3.2 Trennung von PNA und DHFR mittels Kapillarelektrophorese

Die Trennungsbedingungen können bei einer HPLC-Trennung nur in einem begrenzten Rahmen variiert werden, da das Milieu den Ansprüchen der stationären Phase gerecht werden muss. Diese Pufferbedingungen unterscheiden sich jedoch stark von physiologischen Bedingungen, unter denen die selektierten Moleküle idealerweise ihre Zielmoleküle binden sollten. Daher wurde als Alternative zur chromatografischen Trennung mittels HPLC die Trennung von PNA und PNA/Zielmolekül Komplexen in einer Kapillarelektrophorese etabliert. Die Trennungsbedingungen, wie der pH-Wert des Laufpuffers, sowie dessen Salzkonzentration konnten in diesem System über einen weiten Bereich variiert werden. Wie bei allen elektrophoretischen Methoden beruht auch bei der Kapillarelektrophorese die Trennung auf dem Verhältnis von Größe und Ladung der Substanzen. Bei Peptid Nukleinsäuren handelt es sich jedoch um ungeladene Verbindungen. Die Ladung der thermostabilen DHFR war vom pH-Wert des Laufpuffers abhängig.

Bei der Trennung von Substanzgemischen über eine unbeschichtete Quarzkapillare bewirkt der Elektroosmotische Fluss (EOF) auch eine Migration der

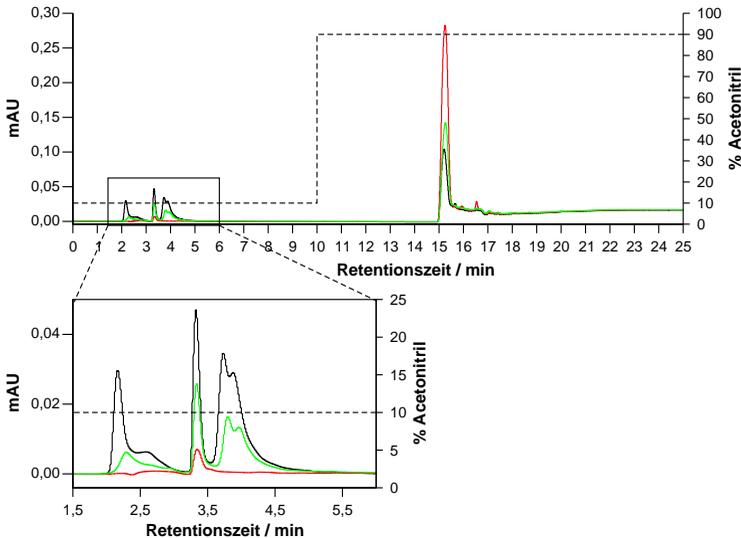


Abbildung 4.7 Chromatogramme der HPLC Trennung thermostabiler DHFR und PNA. Die gestrichelte Linie stellt den Verlauf des Acetonitril-Anteils im Laufmittel dar. Zwischen dem Konzentrationssprung und der Elution der hydrophoberen Substanzen bei 15 min liegt eine Verzögerung von ca. 5 min, die gerätespezifisch ist. Die untere Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Chromatogramms. Es ist zu erkennen, dass im Trennungslauf, der nur PNA enthielt (rot) nahezu keine Substanzen in einem Zeitraum zwischen 1,5 und 6 min von der Säule eluierten. Die DHFR eluierte demzufolge nach 3,9 min. Die PNA wurde nach 15 min durch einen Sprung im Lösungsmittelgradienten von der Säule eluiert. Bei dem Signal mit einer Retentionszeit von ca. 2,4 min und 3,4 min handelte es sich um Proteinfragmente. Die Parameter der Trennung sind auf Seite 190 beschrieben. **schwarz:**DHFR; **rot:**PNA; **grün:** PNA und DHFR.

ungeladenen Substanzen. Die Verbindungen mit einer elektrischen Ladung erfahren relativ zum EOF eine Verschiebung zu kürzeren oder längeren Retentionszeiten. Die Trennung über unbeschichtete Kapillaren in einem pH-Bereich von 5 - 8,5 ergab Differenzen der Retentionszeiten von DHFR und PNA die im Bereich von 2 - 3 min lagen, was für eine effektive Trennung von PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexen nicht ausreichte, zumal aufgrund der geringen Menge kein Signal für die PNA/Zielmolekül-Komplexe zu erwarten war. Auch der Einsatz von Mizellarer Elektrokinetischer Chromatografie (MEKC) mit 25 - 50 mM SDS im Laufpuffer führte zu keiner ausreichenden Trennung (Daten nicht gezeigt).

Bei der Trennung über Kapillaren, bei denen der Elektroosmotische Fluss mittels einer Beschichtung aus Polyacrylamid (PAA) oder Polyvinylalkohol (PVA) an der Innenseite der Kapillaren vollständig unterdrückt wurde, fand

aufgrund der fehlenden Ladung keine Migration der PNA statt. Auch eine resultierende Ladung der DHFR hervorgerufen durch den pH-Wert des Laufpuffers war nicht ausreichend, um eine Migration des Proteins durch die verwendeten mit PAA oder PVA beschichteten Kapillaren in einem Zeitraum von 60 min bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Spannungspolungen hervorzurufen (Daten nicht gezeigt).

Oxidation der Disulfidbrücke an der PNA

Da es sich sowohl bei der PNA als auch bei der DHFR um ungeladene Moleküle handelt, erfuhren diese in einer beschichteten Kapillare ohne EOF keine Migration. Die Erzeugung einer Ladung bei nur einem dieser Moleküle, würde ideale Voraussetzungen für eine Trennung gewährleisten, da diese Komponente als einzige durch die Kapillare wandern würde und lediglich an deren Ende aufgefangen werden müsste, was die Fraktionierung extrem erleichtern würde. Die Einstellung der pH-Werte der Laufpuffer auf Werte, die vom pI der thermostabilen DHFR abwichen, führte zu keiner ausreichenden effektiven Ladung für eine Migration der DHFR. Daher sollte eine Ladung an der PNA generiert werden, indem die Disulfidbrücke, die sich in der Verbindung zur Biotin-Gruppe befand mit Perameisensäure zum Sulfonat oxidiert wurde (Abbildung 4.8).

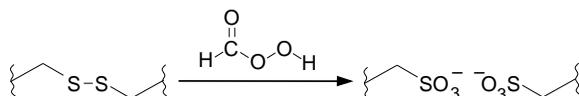


Abbildung 4.8 Oxidation einer Disulfidgruppe zum Sulfonat durch Perameisensäure. Um die Perameisensäure zu erzeugen wurde H_2O_2 (30 %ig) mit Ameisensäure im Verhältnis 1:9 (v/v) gemischt und 2 h bei RT inkubiert. Zu 190 μl der hergestellten Perameisensäure Lösung wurden in einem gekühlten Reaktionsgefäß 10 μl einer Lösung gegeben, die die biotinylierte PNA in einer Konzentration von 100 μM enthielt. Die Mischung wurde 24 h bei 0 °C inkubiert, anschließend gefriergetrocknet und in 100 μl H_2O aufgenommen.

Die PNA, die somit eine Sulfonatgruppe und damit eine negative Ladung trug, zeigte bei einer kapillarelektrophoretischen Trennung eine deutliche Migration (Abbildung 4.9).

Die DHFR, die bei diesem pH-Wert elektrisch neutral vorlag, passierte den Detektor in einem Zeitraum von 60 min nicht (Daten nicht gezeigt). Das Verhalten von PNA/DHFR-Komplexen mit sulfonierter PNA konnte nicht ermittelt werden, da eine an DHFR bindende PNA nicht zur Verfügung stand. Aufgrund der molaren Masse der DHFR von ca. 20 kDa ist jedoch eine wesentlich langsamere Migration der PNA/DHFR-Komplexe im Vergleich zur freien PNA (ca. 5 kDa) bei der Trennung zu erwarten.

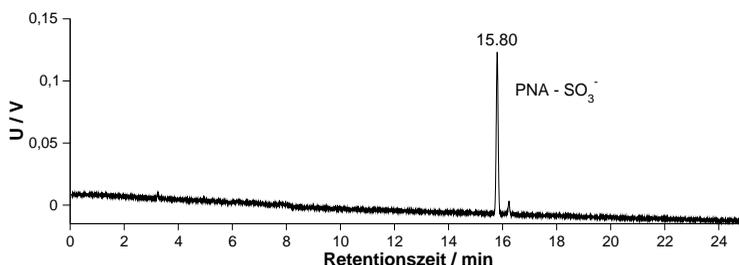


Abbildung 4.9 Elektropherogramm von PNA mit einer oxidierten Disulfidgruppe in einer kapillarelektrophoretischen Trennung. Aufgrund der Oxidation trug die PNA eine Sulfonatgruppe und migrierte im Gegensatz zu unbehandelter PNA aufgrund ihrer Ladung durch die Kapillare und konnte nach ca. 16 min detektiert werden. Die Kapillare mit einer effektiven Länge von 60 cm, einer Gesamtlänge von 80 cm und einem Innendurchmesser von 75 μm war mit Polyacrylamid belegt, was den Elektroosmotischen Fluss vollständig unterdrückte. Der Laufpuffer enthielt 20 mM Na_2HPO_4 (pH 7,3). Bei der Trennung befand sich die Anode an der Detektorseite. Die angelegte Spannung betrug 310 V/cm. Die Temperatur der Kapillare betrug 28 °C. Die Detektion erfolgte mit einem Absorptionsdetektor bei 254 nm. Injektion: hydrodynamisch für 2 s.

Zusatz von SDS in den Trennungspuffer

Bei der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatografie werden geladene Detergentien in einer Konzentration eingesetzt, die über ihrer kritischen Mizellaren Konzentration (CMC) liegt. Das meist genutzte Detergens dabei ist SDS, dessen CMC bei ca. 8 mM liegt, was jedoch denaturierende Effekte auf Proteine hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine effektive Trennungsmethode von PNA und DHFR in einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare mit einem ID von 50 μm etabliert werden. Der Laufpuffer bei dieser Trennung enthielt SDS in einer Konzentration von 0,2–0,6 mM, was 5,8–17,3 ‰ entspricht. Diese Konzentration lag weit unter der kritischen Mizellaren Konzentration und inhibierte die Aktivität der DHFR nur unwesentlich (Abbildung 4.10). In den Elektropherogrammen in Abbildung 4.11 ist zu erkennen, dass die DHFR nach 8 bis 10 min den Detektor passiert. Die Retentionszeit ist dabei offenbar abhängig von der SDS-Konzentration im Laufpuffer. PNA migriert so langsam durch die Kapillare, dass auch nach 20 min kein Signal erhalten wird. Das Laufverhalten von PNA/DHFR-Komplexen bei dieser Trennungsmethode konnte nicht gezeigt werden, da eine an DHFR bindende PNA nicht zur Verfügung stand.

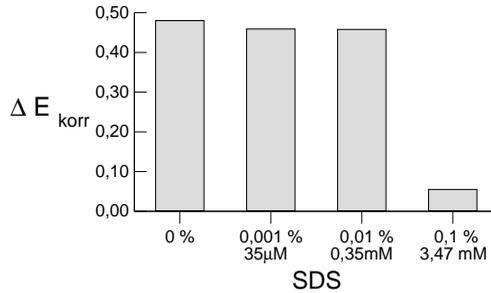


Abbildung 4.10 Aktivitäts-Test für DHFR in Puffern mit verschiedenen SDS-Konzentrationen.

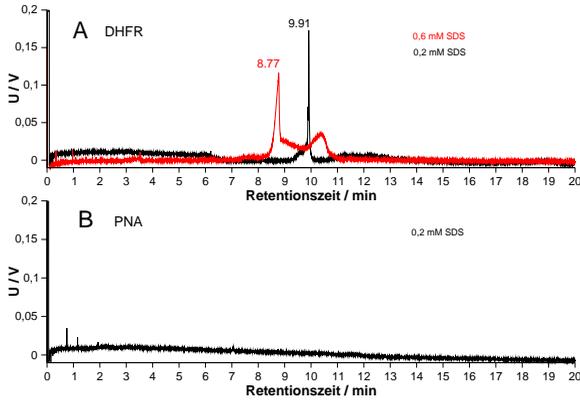


Abbildung 4.11 Elektropherogramme von PNA und thermostabiler DHFR in einer kapillarelektrophoretischen Trennung. Die Parameter der Trennung sind auf Seite 190 beschrieben. **A:** Trennung von DHFR bei verschiedenen SDS Konzentrationen (rot und schwarz); **B:** PNA. Injizierte PNA migriert aufgrund der fehlenden Ladung nicht durch die Kapillare und kann in einem Zeitraum von 20 min nicht detektiert werden.

4.2 Identifizierung von PNA

Bei der Selektion von Molekülen aus einer kombinatorischen Bibliothek besteht der letzte Schritt des Selektionsprozesses stets aus der Analyse der selektierten Moleküle. Eine Technologie, die es ermöglicht, die Sequenzen von PNA zu ermitteln, war jedoch nicht existent. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Ansätze erarbeitet werden, die eine Identifizierung von unbekanntem PNA-Sequenzen ermöglichen.

Erstellung eines Modellsystems zur PNA-Sequenzermittlung

Um ein Modellsystem zur PNA-Identifizierung zu etablieren, wurde eine PNA bekannter Sequenz aus 18 Monomeren synthetisiert, an der N-terminal ein Biotinrest über einen Linker angefügt worden war, der eine reduktiv spaltbare Disulfidbrücke enthielt (Abbildung 4.12). Die bei verschiedenen Identifizierungs-Experimenten generierten Sequenzen konnten so mit der bekannten PNA-Sequenz abgeglichen werden, um die Eignung der Identifizierungstechniken zu prüfen.

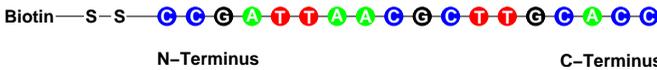


Abbildung 4.12 Schema und Sequenz der PNA für die Etablierung des Modellsystems zur PNA-Sequenzermittlung. Die PNA besteht aus 18 Monomeren und ist am N-Terminus biotinyliert. Die chemische Verbindung, durch die der Biotinrest angefügt ist, enthält eine reduktiv spaltbare Disulfidgruppe.

4.2.1 Identifizierung von PNA durch Hybridisierung an DNA-Bibliotheken

Ein Ansatz zur Ermittlung der Sequenz einer unbekanntem 18mer PNA sah eine Hybridisierung der PNA an komplementäre Oligomere aus einer DNA-Bibliothek vor, die über 18 randomisierte Nucleotide verfügten und jeweils am 3'- und am 5'-Ende von bekannten Primerregionen aus 15 Nucleotiden flankiert wurden. Nach Hybridisierung sollten die DNA/PNA-Hybride von den nicht hybridisierten DNA-Molekülen abgetrennt werden. Ergänzend sollte die nicht hybridisierte DNA durch enzymatische Degradierung entfernt werden. Anschließend wurde vorgesehen, die zur PNA komplementären Nucleinsäuren spezifisch zu amplifizieren und zu sequenzieren, um aus deren Sequenz auf die Sequenz der PNA zurück zu schließen. Der Ablauf der PNA-Sequenzierung

ist schematisch in Abbildung 4.13 dargestellt. Im Folgenden werden Ansätze zur Hybridisierung und Abtrennung von nicht hybridisierter DNA, sowie deren enzymatische Degradierung aufgezeigt.

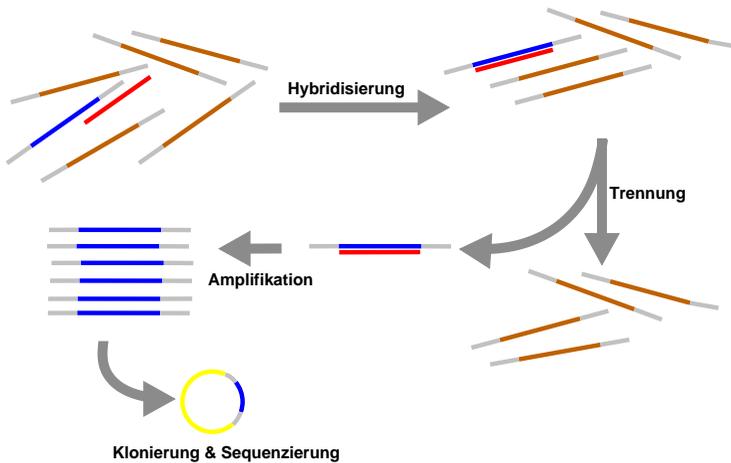


Abbildung 4.13 Ablauf der PNA-Sequenz-Analyse. Die PNA (rot) hybridisiert an die komplementäre Region (blau) eines entsprechenden Oligonukleotides aus der DNA-Bibliothek. Das PNA/DNA-Hybrid wird von den nicht hybridisierten Oligonukleotiden mit nicht passenden randomisierten Sequenzen (braun) abgetrennt und mit Hilfe der bekannten Primerregionen (grau) amplifiziert. Nach Klonierung und Sequenzierung der DNA, kann auf die Sequenz der PNA geschlossen werden.

4.2.1.1 Optimierung der Amplifikation

Bei der Amplifikation der komplementären DNA sollten 10^5 Moleküle der PCR-Vorlage ausreichend sein, um eine für eine Klonierung ausreichende DNA Menge herzustellen. Um die Effizienz zu evaluieren, wurden PCR mit variierenden Mengen des Oligonukleotides Pos2 als Vorlage von 0 bis 10^{11} Molekülen und unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase, sowie DeepVentR (*exo*⁻)-DNA-Polymerase durchgeführt. Bei der Benutzung von *Taq*-DNA-Polymerase wurde ausgehend von dieser Menge an Vorlagemolekülen keine ausreichende Amplifikation der DNA erreicht. Eine Erhöhung der Enzymmenge führte hierbei zu unspezifischer Amplifikation. Bei der Verwendung von DeepVentR (*exo*⁻)-DNA-Polymerase wurde jedoch eine hinreichende Amplifikation erreicht. Abbildung 4.14 zeigt die PAGE-Analyse verschiedener PCR-Ansätze, die *Taq*- bzw. DeepVentR(*exo*⁻)-DNA-Polymerase enthielten.

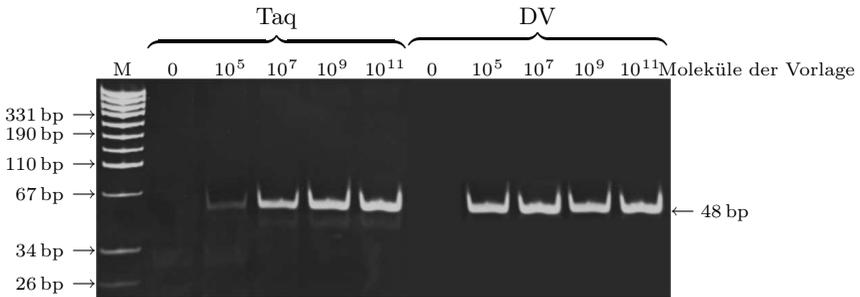


Abbildung 4.14 Die Amplifikate der DNA-Bibliothek (48 bp) wurden nach der PCR auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Die Ansätze mit einem Volumen von 50 μ l enthielten verschiedene Mengen der Vorlage (Oberkante). Durchführung und Zusammensetzung der PCR-Reaktion ist im Anhang auf Seite 190 beschrieben. Bei Verwendung von DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase ist schon bei 10⁵ Molekülen der Vorlage eine hinreichende Ausbeute gewährleistet. **Taq**: Ansätze mit Taq-DNA-Polymerase; **DV**: Ansätze mit DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase; **M**: DNA Standard; (pUC19/MspI)

4.2.1.2 Hybridisierung der PNA

Der erste Schritt bei der Identifizierung von PNA mit Hilfe von Oligonukleotid-Bibliotheken bestand in der Hybridisierung von PNA an die jeweiligen komplementären Oligomere einer DNA-Bibliothek. Bei einem randomisierten Bereich von 18 Nukleotiden beträgt die Diversität der möglichen Sequenzen $6,87 \times 10^{10}$. Bei 10⁵ Kopien pro möglicher Sequenz beträgt die Anzahl der Moleküle $6,87 \times 10^{15}$, was einer Stoffmenge von 11,41 nmol entspricht. Für die Hybridisierung von PNA an eine DNA-Bibliothek wurden daher 12 nmol DNA-Bibliothek (Pos2) mit 10⁵ PNA Molekülen in 10 mM NaH₂PO₄-Puffer (pH 7,5) 5 min auf 92 °C erhitzt und in einem isolierten Gefäß über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen auf 26 °C abgekühlt.

4.2.1.3 Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden durch Immobilisierung

Vor der Amplifikation der komplementären DNA mussten die Oligonukleotide, die nicht an die PNA hybridisierten, entfernt werden. Dazu wurde zunächst das PNA/DNA-Hybrid über die Biotingruppe an der PNA auf verschiedenen Streptavidin-beschichteten Oberflächen bzw. Matrices immobilisiert und die nicht hybridisierten Oligonukleotide durch Waschen entfernt.

Anschließend wurden mittels PCR nicht entfernte DNA-Moleküle nachgewiesen.

Immobilisierung in Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäßen

Um eine spezifische Amplifikation der komplementären Oligonukleotide aus der DNA-Bibliothek zu gewährleisten, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Menge der unspezifisch gebundenen Oligonukleotide, die nicht an eine PNA hybridisierten, hinreichend gering war. Dazu wurden verschiedene Waschvorgänge für Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße evaluiert, indem die DNA-Bibliothek in die Reaktionsgefäße gegeben und diese bei RT über Nacht geschüttelt wurden, um spezifisch an Streptavidin oder an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes bindende Oligonukleotide zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung in neue Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße überführt, und wiederum über Nacht bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde dann aus dem Reaktionsgefäß entfernt und dieses mit verschiedenen Waschpuffern gewaschen, wobei die Anzahl der Waschschrte variiert wurde. Anschließend wurde in den Reaktionsgefäßen eine PCR durchgeführt. Die Amplifikate wurden in einer PAGE analysiert (Abbildung 4.15). Da keine biotinylierte PNA zugegeben wurde, waren bei einer ausreichenden Effektivität der Waschvorgänge keine Amplifikate zu erwarten. Bei allen Ansätzen waren jedoch Amplifikate vorhanden, was auf eine unzureichende Entfernung der Oligonukleotide zurückzuführen war, die als PCR-Vorlage dienten.

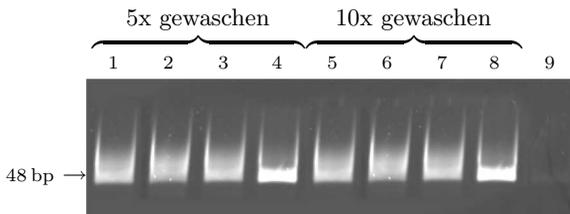


Abbildung 4.15 Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße wurden mit DNA-Bibliothek (12 nmol; Pos2) inkubiert und mit 150 μ l diverser Puffer und variierenden Wiederholungen gewaschen. Nach den Waschgängen wurden in den Gefäßen eine PCR durchgeführt. Die Durchführung ist im Anhang auf Seite 191 beschrieben. Die Ansätze wurden auf einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Waschpuffer für die verschiedenen Ansätze waren: **Bahn 1+5:** PBS; **Bahn 2+6:** 5x SSC; **Bahn 3+7:** Waschpuffer(Gimble); **Bahn 4+8:** Waschpuffer 2. **Bahn 9:** Negativkontrolle in Streptavidin beschichtetem Reaktionsgefäß ohne DNA.

Immobilisierung auf Streptavidin-Magnetpartikeln

Da bei Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäßen die Entfernung unspezifisch bindender Oligonukleotide durch Waschen nicht ausreichend war, wurden alternativ Streptavidin-tragende Magnetpartikel für die Immobilisierung der PNA verwendet. Die Partikel hemmten jedoch die Amplifikationsreaktionen schon bei Zugabe von 1 µl der Suspension vollständig (Abbildung 4.16). Trotz der Möglichkeit, die PNA/DNA-Hybride reduktiv von den Magnetpartikeln abzuspalten, wurde diese Vorgehensweise jedoch zugunsten von Streptavidin-Agarose verworfen, da das Waschen der Partikel mit Hilfe eines Permanentmagneten zu großen Verlusten führte.



Abbildung 4.16 Die 50 µl PCR-Ansätze (95 °C, 6 min Primärdenaturierung; 94 °C, 45 s; 38 °C, 1 min; 72 °C, 30 s, 30 Zyklen), die verschiedene Mengen der Magnetpartikel-Suspension (Oberkante), sowie 10⁶ Moleküle (Pos2) als PCR Vorlage enthielten, wurden auf einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. M: Referenz-DNA

Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die PCR durch die Anwesenheit von Streptavidin-tragenden Magnetpartikeln gestört wird. Den gleichen Effekt zeigte auch die Anwesenheit von Streptavidin-Agarose in den PCR-Ansätzen (Daten nicht gezeigt). Um die hybridisierte DNA amplifizieren zu können, wurde eine reduktiv spaltbare Disulfidbrücke im Linker zwischen der PNA und dem Biotinrest genutzt, um die PNA/DNA-Hybride vor der Amplifikation spezifisch von der Matrix abzuspalten. Die Effizienz der Waschgänge an Streptavidin-Agarose wurde evaluiert, indem die DNA-Bibliothek mit Streptavidin-Agarose inkubiert wurde, um spezifisch an Agarose oder Streptavidin bindende Oligonukleotide zu entfernen. Die vorinkubierte DNA-Lösung wurde wiederum mit Streptavidin-Agarose Suspension geschüttelt und anschließend mit variierenden Volumina Waschpuffer 2 gewaschen. Die Matrix wurde in einem Puffer, der DTT enthielt, aufgenommen, der auch für die reductive Spaltung der Disulfidbrücke im Linker an der PNA, verwendet werden sollte. Nach einer Gelfiltration wurde das jeweilige Eluat mit den nötigen

Komponenten für eine PCR komplementiert und die enthaltene DNA amplifiziert. Da die Ansätze keine PNA enthielten, waren bei einer hinreichend effektiven Entfernung der unspezifisch bindenden DNA keine Amplifikate zu erwarten. In der Abbildung 4.17 sind jedoch bei allen Ansätzen deutliche Amplifikate zu erkennen, was auf die Anwesenheit von hinreichenden Mengen der PCR-Vorlage auch nach der Waschprozedur schließen lässt. Die Entfernung der unspezifisch bindenden DNA durch Waschen schien somit unzureichend.

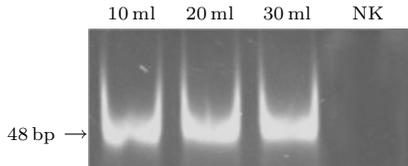


Abbildung 4.17 Amplifikation von unspezifisch gebundener DNA an Streptavidin-Agarose-Matrix. Die Matrix wurde 4 h bei RT mit 12 nmol der DNA-Bibliothek geschüttelt, die an Streptavidin-Agarose vorinkubiert wurde, um spezifisch an Agarose oder Streptavidin bindende Oligonukleotide zu entfernen. Anschließend wurde die Matrix mit verschiedenen Volumina Waschpuffer 2 (Oberkante Gel) in einer Säule gewaschen. Die Durchführung ist im Anhang auf Seite 191 beschrieben. Die PCR-Ansätze wurden auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. **NK**: Negativkontrolle ohne DNA

Abtrennung freier ssDNA im elektrischen Feld

Da nach der Immobilisierung der PNA/DNA-Hybride an eine Matrix nicht hybridisierte Oligonukleotide durch Waschprozeduren nicht hinreichend entfernt werden konnten, wurde die Matrix nach dem Waschen mit Waschpuffer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Oligonukleotide, die nicht an immobilisierter PNA hybridisiert waren sollten so durch elektrostatische Wechselwirkungen von der Matrix getrennt werden. Um eine Diffusion der DNA in den oberen Puffer zu verhindern, befand sich die Matrix, die die PNA/DNA-Hybride trug, in einer Säule auf einer Agaroseschicht, in die die entfernte DNA eindringen konnte, aus der sie jedoch nicht unmittelbar nach dem Ausschalten des elektrischen Feldes heraus diffundieren konnte (Abbildung 4.18). Nach der Abtrennung der nicht hybridisierten DNA sollten die PNA/DNA-Hybride reaktiv von der Matrix abgespalten und in einer PCR überprüft werden. Bei Abwesenheit von PNA sollten daher keine Amplifikate erhalten werden. Um dies zu prüfen, wurde die DNA-Bibliothek mit Streptavidin-Agarose vorinkubiert und die vorinkubierte DNA Lösung mit wiederum mit Streptavidin-Agarose Suspension geschüttelt. Kontrollansätze enthielten 10^5 PNA/DNA-Hybride. Anschließend wurde die Streptavidin-Agarose mit 30 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Die Matrix wurde danach in die Säule pipettiert

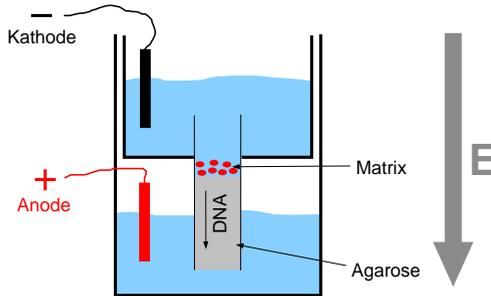


Abbildung 4.18 Darstellung der Apparatur zur Entfernung freier bzw. schwach gebundener DNA von einer Matrix (rot). Eine Säule (ID = 5 mm), die sich zwischen zwei Pufferreservoirs befindet, war im unteren Teil mit 1%-iger Agarose (grau) gefüllt. Die Matrix wurde in die Säule gegeben und sedimentierte auf der Agarose. Es wurde ein elektrisches Feld angelegt, das so gepolt war, dass an der Matrix unspezifisch gebundene DNA durch die Agarose in das untere Pufferreservoir migrierte. Auch nach Abschalten des elektrischen Feldes konnte diese daher nicht zurück diffundieren und die Matrix kontaminieren.

und einer Spannungsdifferenz von 100 V ausgesetzt. Die Matrix wurde anschließend in reduzierendem Puffer inkubiert. Nach einer Gelfiltration wurde die Lösung mit den nötigen Komponenten für eine PCR versetzt und die enthaltene DNA amplifiziert. Es wurden je vier Ansätze mit und ohne PNA durchgeführt. Die Analyse der Amplifikate ist in Abbildung 4.19 dargestellt.

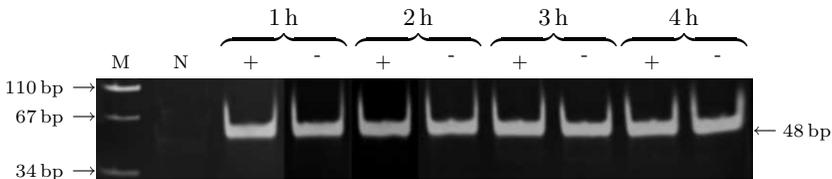


Abbildung 4.19 Analyse der Amplifikate nach der Abtrennung freier ssDNA von einer Agarose-Matrix im elektrischen Feld. Die vorinkubierte DNA (Pos2) wurde mit Streptavidin-Agarose 3 h bei RT inkubiert. (+) Kontrollansätze enthielten zudem 10^5 PNA/DNA-Hybride, die im Vorfeld hybridisiert und entsprechend verdünnt wurden. Die Matrices der Ansätze wurden mit 30 ml Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend in 1x TBE-Puffer für 1–4 h einer Spannungsdifferenz von 100 V ausgesetzt. Anschließend wurden die über eine Disulfidgruppe gebundenen PNA/DNA-Hybride durch 2 h Inkubation bei RT in 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) mit 20 mM DTT von der Matrix reaktiv abgespalten. Nach Gelfiltration der Ansätze wurden diese mit den nötigen Komponenten für eine PCR versetzt und die enthaltene DNA amplifiziert. M: DNA Standard (pUC19/MspI); N: Negativkontrolle für PCR;

Die PAGE Analyse zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede der DNA Menge bei den Ansätzen mit und ohne PNA auftraten. Die Dauer der Spannungsexposition schien ebenfalls keinen ausgeprägten Effekt auf die DNA Menge zu haben. Auch die Abtrennung der freien DNA in einem elektrischen Feld war daher ungeeignet.

4.2.1.4 Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden mittels HPLC

Eine alternative Trennungsmethode von PNA/DNA-Hybriden und nicht hybridisierter DNA stellte die chromatografische Trennung mittels HPLC dar. Diese wurde mit einer Mischung aus 48 Nukleotiden langer ssDNA und komplementärer PNA im Verhältnis 2:1 evaluiert. Bei der Verwendung einer unpolaren HPLC Säule (*reverse phase*) und den mobilen Phasen Triethylammoniumacetat-Puffer und Acetonitril konnte eine Trennung erreicht werden, bei der die Retention der beiden Stoffe um ca. 7 min auseinander lag. Da bei einer Hybridisierung von marginalen PNA Mengen an einer Bibliothek kein Signal für die PNA/DNA-Hybride zu erwarten war, sollten diese lediglich aufgrund ihrer Retentionszeiten aufgefangen werden, was eine hinreichend effektive und reproduzierbare Trennung voraussetzte. In Abbildung 4.20 sind die Chromatogramme der HPLC-Trennungen dargestellt.

Nachdem 48 nt ssDNA als Referenz injiziert wurde, wurde der DNA-Probe PNA zugesetzt, wobei ein zusätzliches Signal mit einer Retentionszeit von etwa 13 min erhalten wurde. Hierbei handelte es sich um DNA/PNA-Hybride, da nicht hybridisierte PNA bei gleichen Trennungsbedingungen in dem dargestellten Zeitraum nicht von der Säule eluiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Amplifikation der DNA abgetrennter PNA/DNA-Hybride

Die PNA/DNA-Hybride, die bei der Inkubation einer unbekanntnen PNA mit den passenden Teilen einer DNA-Bibliothek entstehen, sollten mit Hilfe von HPLC abgetrennt werden. Die DNA aus den Hybriden sollte anschließend amplifiziert werden. Dazu wurde das Eluat fraktioniert, aufgefangen, gefriergetrocknet und enthaltene DNA in einer PCR amplifiziert. Da die Menge der PNA/DNA-Hybride für ein Absorptionssignal nicht ausreichte, sollte die Elution der PNA/DNA-Hybride reproduzierbarer durchgeführt werden, indem der Acetonitrilanteil anstatt in einem linearen Gradienten mit einem Sprung von 13% auf 50% bei 7,5 min erhöht wurde. Das Chromatogramm

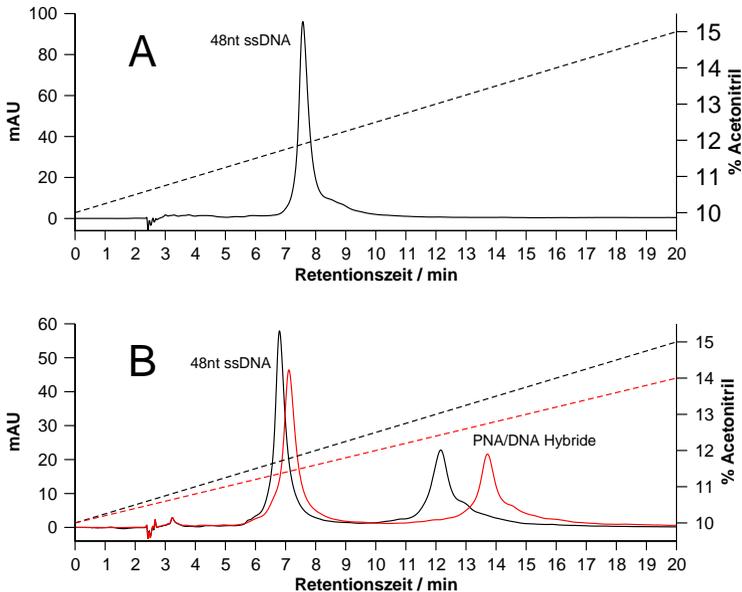


Abbildung 4.20 Trennung von 48 nt ssDNA und DNA/PNA-Hybriden bestehend aus 48 nt ssDNA und einer komplementären 18mer PNA mittels HPLC (Parameter siehe Seite 191). **(A)** 48 nt ssDNA mit einem Gradienten von 10–15 % Acetonitril; **(B)** 48 nt ssDNA und 18mer PNA im molaren Verhältnis 2 : 1 wurde mit unterschiedlichen Lösungsmittelgradienten von **(schwarz)** 10–15 % Acetonitril und **(rot)** 10–14 % Acetonitril jeweils über 20 min getrennt.

ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die einzelsträngige DNA nach 2–2,5 min eluiert. Die Fraktionen wurden im Zeitraum von 10–15 min aufgefangen.

Die Analyse der Amplifikate ist in Abbildung 4.22 dargestellt und zeigt, dass keiner der PCR-Ansätze DNA der erwarteten Größe aufwies. Die Amplifikation der Fraktion 2 beinhaltet zwar eine größere Menge DNA, jedoch besaß diese nicht die richtige Größe und wies eine Größenverteilung auf, was auf eine unzureichende Spezifität bei der Amplifikation zurückgeführt werden konnte.

4.2.1.5 Abtrennung von PNA/DNA-Hybriden mittels Kapillarelektrophorese

Da die Abtrennung freier ssDNA von den entstandenen PNA/DNA-Hybriden eine hohe Trennungseffizienz erforderte, stellten kapillarelektrophoretische Methoden eine attraktive Alternative zur Trennung durch Immobilisierung

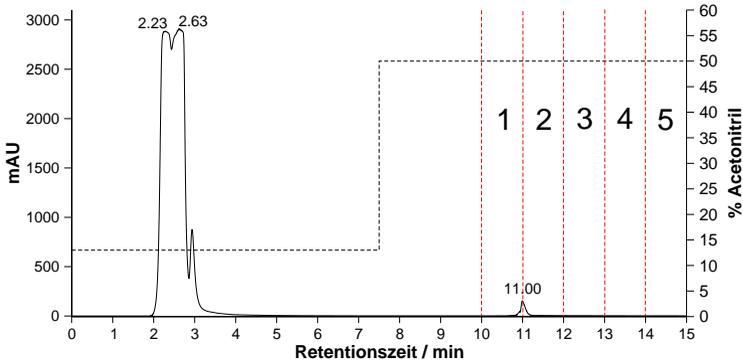


Abbildung 4.21 Abtrennung von 48 nt ssDNA in großem Überschuss nach der Hybridisierung von 10^5 Molekülen PNA mit 12 nmol der ssDNA Bibliothek Pos2(5) mittels HPLC. Die Parameter der Trennung sind auf Seite 191 beschrieben. Da die Menge der PNA/DNA-Hybride für ein Signal nicht ausreichend war, wurden fünf verschiedene Fraktionen der Elution zwischen 10 und 15 min aufgefangen und die enthaltene DNA amplifiziert (Markierungen).

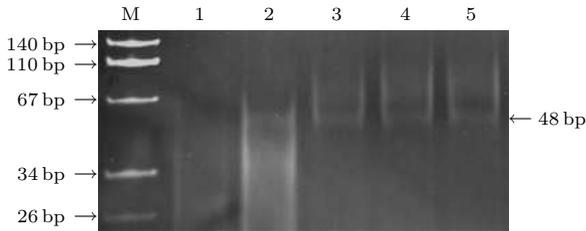


Abbildung 4.22 Analyse der Amplifikate aus den gefriergetrockneten Eluaten. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 1,3 ml. Die Rückstände nach der Gefrierdrying wurden in 50 μ l PCR-Ansätzen aufgenommen und 37 Amplifikationszyklen unterzogen (95 °C, 6 min Primärdenaturierung; 94 °C, 45 s; 41 °C, 30 s; 72 °C, 30 s). Die PCR-Produkte wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. 1-5: Fraktionen aus HPLC-Trennung in Abbildung 4.21; M: DNA-Standard (pUC19/MspI).

und Waschen oder HPLC dar. Da die Anzahl der Kopien komplementärer DNA in der handhabbaren Menge von 12 nmol der Bibliothek 10^5 betrug, waren auch PNA/DNA-Hybride in einer Anzahl zu erwarten, die in dieser Größenordnung lag. Aufgrund dieser extrem geringen Menge von $1,7 \times 10^{-19}$ mol war kein Detektorsignal für die PNA/DNA-Hybride im Elektropherogramm zu erwarten. Ebenso wie bei der Trennung dieser beiden Spezies durch HPLC, war daher auch hier eine effektive und reproduzierbare Trennung notwendig. Um diese zu etablieren, wurde ein Gemisch des PNA-komplementären Oligonukleotides Pos2D2-1rev und PNA im molaren Verhältnis 2 : 1 verwendet.

Ergebnisse

Dies enthielt daher sowohl freie DNA, als auch PNA/DNA-Hybride. Zwecks einer besseren Reproduzierbarkeit wurde die Trennung zunächst über eine mit PVA beschichteten Kapillare mit 330 V/cm (ID = 75 μ m) in 30 mM Tris-HCl pH 7,5 durchgeführt. Da der elektroosmotische Fluss durch die Beschichtung unterdrückt wurde, wurde die Polung dementsprechend gewählt, dass die Anode detektorseitig lag. Die Trennung der Substanzen erfolgte daher vorwiegend aufgrund der hydrodynamischen Radien. Unter den gewählten Trennungsbedingungen lag die Differenz der Retentionszeiten im Bereich von 1–2 min, was für eine effiziente Trennung nicht ausreichend war. Auch die Variation verschiedener Parameter, wie pH-Wert und Trennungsspannung, sowie der Zusatz von Mg^{2+} -Ionen konnten die Trennung über eine PVA beschichtete Kapillare nicht signifikant verbessern (Daten nicht gezeigt). Bei der Trennung mit einer unbeschichteten Kapillare betrug die Differenz der Retentionen 2,7 min (Abbildung 4.23). Die Wanderungsgeschwindigkeit der ungeladenen PNA entsprach erwartungsgemäß dem EOF. Die DNA wurde aufgrund ihrer Ladung erst danach detektiert.

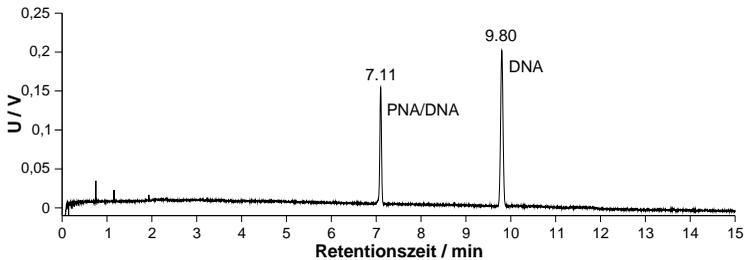


Abbildung 4.23 Elektropherogramm für die Trennung von DNA und PNA/DNA-Hybriden. Die Probe enthielt das Oligonukleotid Pos2D2-1rev in einer Konzentration von 2 μ M und komplementäre 18mer PNA (1 μ M). Die Injektion erfolgte hydrodynamisch (5 s). Die Trennung wurde in 30 mM Tris-HCl pH 7,5 bei einer Spannung von 330 V/cm durchgeführt. Die Kapillare wurde auf 28 $^{\circ}$ C temperiert und hatte einen Innendurchmesser von 75 μ m und eine effektive Länge von 50 cm. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Die Trennung freier ssDNA und PNA/DNA-Hybriden war prinzipiell in einer Kapillarelektrophorese durchführbar, jedoch zeigten Wiederholungen der Trennungsläufe, eine unzureichende Reproduzierbarkeit der Trennungen und einen Drift der Retentionszeiten zu größeren Werten, was diese Methode aufgrund der Tatsache, dass für die gewünschte Fraktion kein Signal erwartet werden konnte, ungeeignet erscheinen ließ. Weiterhin sprachen die relativ geringe Differenz der Retentionszeiten, die bei einer wesentlich größeren Menge von freier ssDNA und einer extrem geringen Menge der PNA/DNA-Hybride

nicht ausreichend war, das extrem geringe Probenvolumen von einigen Nanolitern, sowie die schwierige Fraktionierung gegen die Verwendung dieser Trennungsmethode.

4.2.2 Enzymatischer Abbau von ssDNA

Da die Entfernung unspezifisch bindender Moleküle der DNA-Bibliothek durch physikalische Methoden nicht ausreichend war, wurden Ansätze für einen spezifischen enzymatischen Abbau von nicht an PNA hybridisierten DNA-Molekülen erarbeitet.

4.2.2.1 Spezifischer Abbau nicht hybridisierter DNA durch Endonukleasen

Durch die Verwendung der einzelstrang-spezifischen S1 Nuklease aus *Aspergillus oryzae* und Mungobohnen Nuklease, sollten Komponenten der DNA-Bibliothek, die nicht an PNA hybridisieren konnten, spezifisch degradiert werden. Grundlage für diesen Ansatz war die Resistenz von PNA/DNA-Hybriden sowie von dsDNA gegenüber diesen Nukleasen. Der Schutz vor der Degradierung durch S1 Nuklease durch die Hybridisierung von DNA an PNA wurde bereits beschrieben [100,109]. Dies sollte ebenfalls für Mungobohnen Nuklease evaluiert werden, da diese weniger stabil ist, als S1 Nuklease und damit vor der Amplifikation der DNA leichter thermisch inaktiviert werden kann. Nach der Hybridisierung der PNA sollten die Primerregionen der DNA durch komplementäre Oligonukleotide geschützt werden. Die mittlere randomisierte Region der Bibliothekskomponenten sollte gegebenenfalls durch eine komplementäre PNA vor der Degradierung durch die Nukleasen bewahrt werden. DNA ohne komplementäre PNA war hingegen für den Abbau zugänglich. Das Prinzip der spezifischen Degradierung durch einzelstrangspezifische Endonukleasen ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

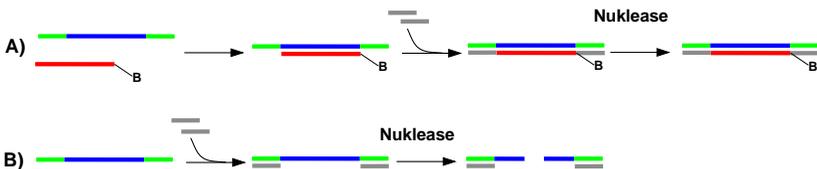


Abbildung 4.24 Degradierung von freier ssDNA durch einzelstrangspezifische Nukleasen. Nach der Hybridisierung der PNA (rot) an die komplementäre Region der DNA (blau), hybridisieren komplementäre Oligonukleotide (grau) an die Primerregionen (grün). **(A)** Ist eine entsprechende PNA vorhanden, wird die DNA auf der ganzen Länge gegen eine Degradierung durch die Nuklease geschützt. **(B)** Bleibt die mittlere Region frei, wird die einzelsträngige DNA abgebaut und ist für die Amplifikation durch eine PCR nicht mehr zugänglich.

Degradierung durch Mungobohnen Nuklease

Um die Reaktion für den spezifischen Abbau der DNA mit Mungobohnen Nuklease zu überprüfen, wurde das Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev verwendet, das mit 48 Nukleotiden die Länge der DNA-Bibliothekskomponenten hatte und im mittleren Bereich eine der PNA komplementäre Sequenz besaß, die von Primerregionen flankiert wurde, sowie die zu den Primerregionen komplementären Oligonukleotide Pos3(3)rev und Pos4(3). Vor der Reaktion wurde eine dem Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev äquimolare Menge PNA zugegeben, der Reaktionsansatz 5 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt. Die Primerregionen wurden mit entsprechenden Oligonukleotiden hybridisiert, indem der Ansatz 5 min auf 48 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt wurde, wobei die PNA/DNA-Hybride stabil blieben. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne PNA. Die Verdauungsansätze wurden anschließend mittels PAGE analysiert (Abbildung 4.25).

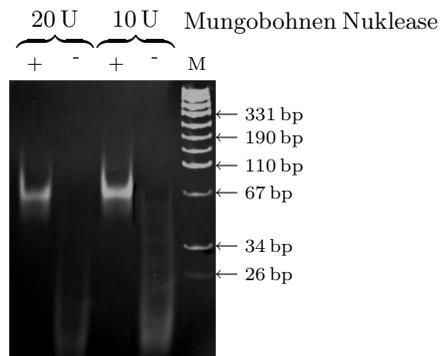


Abbildung 4.25 Analyse der spezifischen Degradierung nicht an PNA hybridisierter ssDNA durch Mungobohnen Nuklease. Oligonukleotide und PNA lagen in Konzentrationen von 1 μ M vor. Die Reaktionen wurden in Mungobohnen Nuklease Reaktionspuffer durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionen ist auf Seite 191 beschrieben. Die Ansätze wurden auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. +: Ansätze mit PNA; -: Ansätze ohne PNA; M: DNA-Standard (pUC19/MspI)

In der Analyse ist ersichtlich, dass die DNA in den Ansätzen mit PNA vor dem Abbau durch die Nuklease geschützt war. Daher war auch Zugabe von 20 U Mungobohnen Nuklease und nach 15 h Inkubation noch eine deutliche DNA-Menge vorhanden. Im unteren Bereich des Gels sind bei den Ansätzen ohne PNA schwach die 15 bp langen Primerregionen zu erkennen, die durch die Hybridisierung mit den jeweils komplementären Oligonukleotiden ebenfalls vor der Degradierung durch die Nuklease geschützt waren.

Kontrolle der Mungobohnen Nuklease Verdauung durch PCR

Da der Abbau der DNA durch Mungobohnen Nuklease für eine Ermittlung der Sequenz hybridisierter DNA vollständig sein musste, wurde mittels einer PCR auf Anwesenheit nicht degradiertes DNA überprüft. Das Enzym musste in der Lage sein, DNA effizient zu hydrolysieren, auch wenn diese in extrem geringen Mengen vorlag. Dies sollte in Reaktionsansätzen überprüft werden, die 10^5 Moleküle freie ssDNA mit einer definierten Sequenz enthielten, bzw. 10^5 PNA/DNA-Hybride, die bereits im Vorfeld hergestellt und entsprechend verdünnt wurden, sowie Oligonukleotide, die komplementär zu den Primerregionen der DNA-Bibliothek waren. Die Reaktionsmischungen wurden erwärmt, um vorhandene Sekundärstrukturen der Schutzoligonukleotide aufzubrechen und langsam auf 20°C abgekühlt, bevor die Mungobohnen Nuklease zugegeben wurde. Nach der Inkubation und thermischer Inaktivierung der Nuklease wurden die Ansätze mittels Gelfiltration gereinigt, da der Nuklease- und der PCR-Puffer nicht kompatibel waren. Die Analyse der Amplifikationsansätze ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

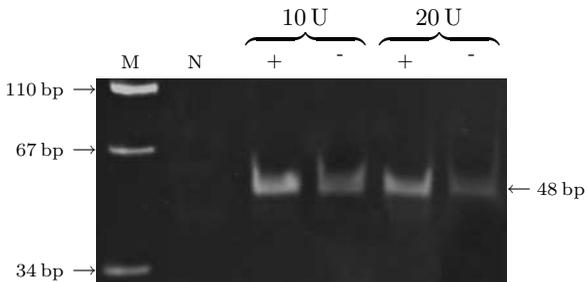


Abbildung 4.26 Amplifikation der DNA nach der Verdauung mit Mungobohnen Nuklease. Die Ansätze enthielten 10^5 Moleküle Pos2D2-1rev (-) bzw. 10^5 PNA/DNA-Hybride aus Pos2D2-1rev und 18mer PNA (+). Weiterhin waren die Oligonukleotide Pos3rev und Pos4, die komplementär zu den Primerregionen waren, in Konzentrationen von je $1\ \mu\text{M}$ enthalten. Die Durchführung ist auf Seite 191 beschrieben. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **N:** Nullkontrolle für PCR ohne Vorlage

Die Analyse der PCR-Produkte zeigt, dass der Abbau der einzelsträngigen DNA durch Mungobohnen Nuklease nicht mit ausreichender Effizienz ablief, um die Vorlage für die PCR bei Abwesenheit von PNA vollständig zu entfernen.

Abbau durch S1 Nuklease

Eine Alternative zur Mungobohnen Nuklease stellte S1 Nuklease dar [166–167]. Der Abbau von nicht hybridisierter DNA sollte nach dem gleichen Schema, wie bei Verwendung von Mungobohnen Nuklease erfolgen (Abbildung 4.24). Die Funktion der S1 Nuklease wurde mit Verdauungsansätzen evaluiert, die das Oligonukleotid Pos2D2-1rev sowie die zu dem Primerregionen komplementären Oligonukleotide Pos3rev und Pos4 enthielten. Analog zu den Ansätzen bei der Nutzung der Mungobohnen Nuklease wurde vorher eine äquimolare Menge PNA mit der mittleren Region des Oligonukleotides hybridisiert. Die PAGE-Analyse der Reaktionsansätze und der Kontrollen ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

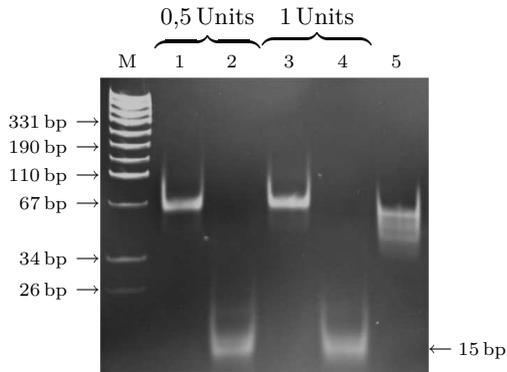


Abbildung 4.27 Analyse der Verdauungsansätze mit S1 Nuklease. Die Ansätze enthielten die Oligonukleotide Pos2D2-1rev, Pos3rev, Pos4 und gegebenenfalls PNA in Konzentrationen von je 1 μM . Nach der Inkubation in S1 Nuklease Reaktionspuffer für 3 h bei 20 °C wurde die DNA auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Bei den Bahnen 1 und 3 fand keine Degradierung der DNA statt, da das Oligonukleotid vollständig geschützt war. Die PNA/DNA-Hybride haben aufgrund der fehlenden Ladung der PNA ein höheres apparentes Molekulargewicht, als normale DNA (Bahn 5). In den Bahnen 2 und 4 wurde die mittlere, nicht geschützte Region abgebaut, wobei die geschützten Primerregionen (15 bp) erhalten blieben. Die Kontrolle in Bahn 5 erscheint aufgrund partieller einzelsträngiger Regionen im nativen Gel nicht als diskrete Bande. **Bahn 1:** mit PNA, 0,5 U S1 Nuklease; **Bahn 2:** ohne PNA; 0,5 U S1 Nuklease; **Bahn 3:** mit PNA, 1 U S1 Nuklease; **Bahn 4:** ohne PNA; 1 U S1 Nuklease; **Bahn 5:** Kontrolle ohne PNA und ohne Nuklease; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI).

Kontrolle der S1 Nuklease Verdauung durch PCR

Im weiteren Verlauf sollte geprüft werden, ob der spezifische Abbau der DNA mit S1 Nuklease auch mit einer ausreichenden Effizienz abläuft, wenn das

Substrat in extrem geringen Mengen vorlag. Dies sollte nach der Verdauung mit S1 Nuklease durch eine PCR überprüft werden, bei der die nicht abgebaute DNA amplifiziert werden sollte. Die Reaktionsansätze enthielten 10^5 Moleküle freie ssDNA mit einer definierten Sequenz bzw. 10^5 PNA/DNA-Hybride, die bereits im Vorfeld hergestellt und entsprechend verdünnt wurden, sowie Oligonukleotide, die komplementär zu den Primerregionen der DNA-Bibliothek waren, um diese vor dem Abbau durch die Nuklease zu schützen. Die Reaktionsmischungen wurden erwärmt, um vorliegende Sekundärstrukturen der Schutzoligonukleotide aufzubrechen und langsam auf 20°C abgekühlt, bevor S1 Nuklease zugegeben wurde. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mittels einer Gelfiltration umgepuffert, da der S1 Nuklease- und der PCR-Puffer nicht kompatibel waren. Die Analyse der Amplifikationsansätze ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

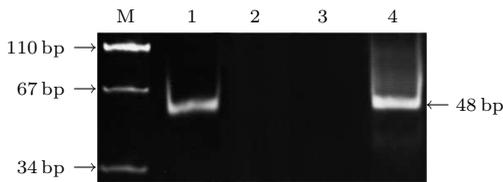


Abbildung 4.28 Analyse der Amplifikationsansätze nach dem Abbau von ssDNA durch S1 Nuklease. Die Ansätze enthielten 10^5 Moleküle des Oligonukleotides Pos2D2-1rev bzw. des entsprechenden PNA-Hybrides. Weiterhin waren die Oligonukleotide Pos3rev und Pos4 in Konzentrationen von $1\ \mu\text{M}$ enthalten. Die Verdauung wurde in S1 Nuklease Reaktionspuffer durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionen ist auf Seite 192 beschrieben. Die Auftrennung erfolgte über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Ansatz mit 10^5 PNA/DNA-Hybriden; **Bahn 2:** Ansatz mit 10^5 Molekülen ssDNA; **Bahn 3:** Negativkontrolle; **Bahn 4:** Positivkontrolle 10^5 DNA-Moleküle; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI).

Es ist zu erkennen, dass nur in dem Ansatz, der PNA enthielt, ein Amplifikat erhalten wurde. In dem Ansatz ohne PNA wurde die einzelsträngige DNA durch S1 Nuklease abgebaut, so dass keine ausreichende Menge der Vorlage für die PCR mehr vorhanden war. Die Degradierung von freier DNA durch S1 Nuklease war daher bei einem Hintergrund von 10^5 DNA-Molekülen hinreichend effizient und wies zudem eine ausreichende Spezifität auf, so dass PNA/DNA-Hybride erhalten blieben.

Abbau von ssDNA nach Hybridisierung mit einer DNA-Bibliothek

Die Degradierung von freier ssDNA durch S1 Nuklease sollte nach einer Hybridisierung von PNA an komplementäre Sequenzen dazu dienen, die nicht hybri-

disierte DNA zu entfernen, da einfache Waschprozeduren dafür nicht ausreichend waren. Nach dem Abkühlen des Hybridisierungsansatzes, der 12 nmol ssDNA-Bibliothek und 10^5 PNA Moleküle einer bekannten Sequenz enthielt, wurden die PNA/DNA-Hybride an Streptavidin-tragende Agarose immobilisiert. Nach der Isolierung der Agarose aus der Reaktionslösung wurde diese in einer Säule mit 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Die reduktive Spaltung der Disulfidbrücke zwischen PNA und der Biotingruppe wurde in 30 μ l Puffer (Tris-HCl, pH 8,5), der 20 mM DTT enthielt, vorgenommen. Nach dem Entfernen der Agarosematrix erfolgte die Zugabe der Oligonukleotide zum Schutz der Primerregionen und 5xS1 Nuklease Puffer zum Eluat, um die nicht hybridisierte DNA mit S1 Nuklease abzubauen. Die Inaktivierung der Nuklease geschah durch Zugabe von EDTA und anschließender Erwärmung. Nach einer Gelfiltration wurde das Filtrat mit den nötigen Komponenten für eine PCR auf 50 μ l aufgefüllt und die hybridisierte DNA amplifiziert. Die erhaltene DNA wurde zur weiteren Analyse in das Plasmid PCR4-TOPO kloniert. Die Überprüfung der Klone hinsichtlich der erwarteten Sequenz wurde vor der Sequenzierung durch eine PCR vorgenommen, bei der ein Primer der erwarteten Sequenz entsprach bzw. komplementär zu ihr war und der andere an der flankierenden Plasmid-DNA hybridisierte. Für jeden Klon wurden zwei PCR durchgeführt, wobei der Primer für die Plasmid-DNA konstant blieb, jedoch jeweils komplementäre Primer für die im Plasmid eingefügte DNA benutzt wurden. So ergab die PCR sowohl Informationen über die Anwesenheit der erwarteten Sequenz, als auch über die Orientierung der eingefügten DNA im Plasmid (Abbildung 4.29).

Nach der Ligation der Amplifikate wurden 14 Klone untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.30 dargestellt. Die Länge des erwarteten Amplifikates betrug 123 bp. Bei Verwendung des Primerpaares M13rev und D2-1rev wurde in allen untersuchten Klonen ein Amplifikat erhalten. Bei der Verwendung des komplementären Primers D2-1 zeigte lediglich die Positivkontrolle, die die erwartete DNA enthielt, ein Amplifikat, was darauf schließen ließ, dass die eingefügte DNA hier in einer anderen Orientierung enthalten war. Die Sequenz der untersuchten Klone zeigte die erwartete Basenabfolge von 18 Nukleotiden, die bei der antiparallelen Hybridisierung an der PNA notwendig war.

Bei der Reproduktion der Experimente zur Sequenzermittlung von PNA durch Hybridisierung an DNA-Bibliotheken stellte die Kontamination der PCR Ansätze durch Moleküle der DNA-Bank, die vor der Hybridisierung in hohen Konzentrationen gehandhabt wurde, jedoch ein Problem dar. Daher sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Möglichkeiten für einen Abbau von ssDNA in weniger kontaminationsanfälligen Systemen erarbeitet werden.

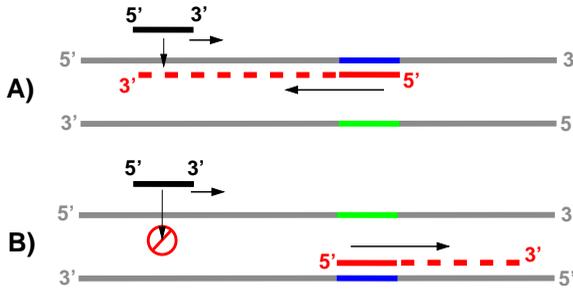


Abbildung 4.29 Test-PCR zur Überprüfung der Klone nach der Ligation amplifizierter DNA hinsichtlich der erwarteten Sequenz und der Orientierung. Es wurde ein vorwärts Primer verwendet (schwarz), der spezifisch an der Plasmid-DNA (grau) hybridisierte. Der rückwärts Primer (rot) war komplementär zur erwarteten Sequenz (blau). Nur wenn die eingefügte DNA die korrekte Sequenz besaß und die richtige Orientierung in der Plasmid-DNA hatte, konnte eine Amplifikation stattfinden (**A**). Hatte die eingefügte DNA eine falsche Sequenz oder eine andere Orientierung, so hybridisierte der rückwärts Primer (rot) am DNA-Gegenstrang und wurde in die falsche Richtung elongiert. Eine Amplifikation mit dem vorwärts Primer (schwarz) konnte somit nicht mehr stattfinden (**B**). Für jeden zu untersuchenden Klon wurden zwei PCR Ansätze durchgeführt, wobei die rückwärts Primer (rot) variiert wurden und komplementäre Sequenzen besaßen. Da nur einer der PCR-Ansätze ein Produkt der erwarteten Länge aufweisen konnte, konnte neben dem Sequenzabgleich auch eine Bestimmung der Orientierung eingefügter DNA im Plasmid durchgeführt werden.

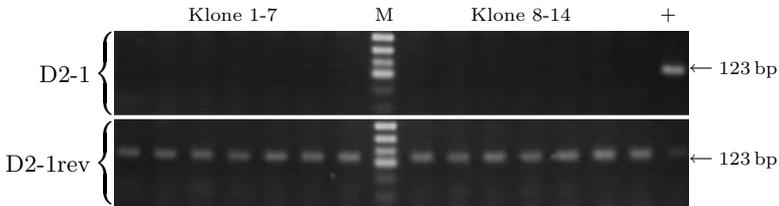


Abbildung 4.30 Kontrolle von 14 Klonen hinsichtlich der Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz. Es wurden jeweils zwei PCR für jeden zu untersuchenden Klon durchgeführt. Das Prinzip der Analyse ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Für die PCR wurden die Primer M13rev und D2-1 bzw. D2-1rev in Konzentrationen von je $1 \mu\text{M}$ in Standard PCR Puffer verwendet. Die Reaktionen enthielten je $1 \mu\text{l}$ der Bakterienkultur der zu untersuchenden Klone. In allen Reaktionen wurde ein Amplifikat mit der erwarteten Länge von 123 bp bei Verwendung der Primer M13rev und D2-1 erhalten. Die DNA war somit bei allen Klonen in der gleichen Orientierung in die Plasmid-DNA eingefügt worden. Die Positivkontrolle, die die erwartete DNA in der anderen Orientierung enthielt, zeigte ein Amplifikat bei der Verwendung der Primer M13rev und D2-1rev. Die Trennung erfolgte in 3% Agarose. Das Temperaturprogramm der PCR ist auf Seite 192 aufgeführt. +: Positivkontrolle; M: DNA-Standard (pUC19/MspI).

Amplifikation der ssDNA ohne Aufreinigung

Da der Puffer für die Funktion der S1 Nuklease und der Puffer für die Amplifikation mittels PCR nicht kompatibel waren, mussten die PNA/DNA-Hybride aus dem Verdauungsansatz vor der Amplifikation aufgereinigt werden, was eine potenzielle Quelle für Kontaminationen darstellte. Es wurde daher eine Möglichkeit entwickelt, die DNA direkt aus dem Ansatz der S1 Nuklease-Verdauung zu amplifizieren, ohne diese vorher aufzureinigen zu müssen.

Die Degradierung der freien DNA und die Amplifikation konnten jedoch nicht in einem Puffer durchgeführt werden, da die Bedingungen im PCR-Puffer mit pH 8 nicht optimal für die Funktion der S1-Nuklease waren. Zudem musste eine Degradierung der Primer vor der PCR durch die S1 Nuklease ausgeschlossen werden, weshalb die Reaktionen getrennt voneinander ablaufen sollten.

Aus diesem Grund wurde ein System aus zwei Puffern entwickelt, von denen einer die Bedingungen für die Funktion der S1 Nuklease erfüllte. Die Zusammensetzungen der beiden Puffer waren so gewählt, dass eine Mischung gleicher Volumina der Puffer die nötigen Bedingungen für eine Amplifikation der DNA durch eine PCR zur Verfügung stellte. Die Funktion der S1 Nuklease wurde dabei durch den endgültigen pH-Wert des Puffers reduziert. Weiterhin wurde durch EDTA das für die S1 Nuklease essentielle Zn^{2+} komplexiert, das eine um den Faktor 10^8 höhere Bindungskonstante an EDTA hat, als das für die PCR benötigte Mg^{2+} , welches im Überschuss zum EDTA vorlag. Die Analyse der Amplifikation in einer Mischung der beiden Puffer ist in Abbildung 4.31 dargestellt. Die Amplifikation in einer 1:1 Mischung der PCR-Puffer 7 und Puffer D zeigt eine vergleichbare Ausbeute zu der in Standard PCR-Puffer.

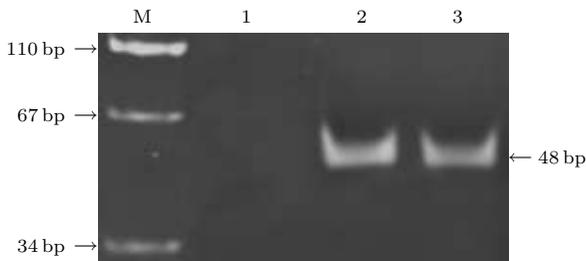


Abbildung 4.31 Test für die Amplifikation von 10^5 DNA-Molekülen in einer Mischung aus Puffer 7 und Puffer D in einem Verhältnis von 1:1 (v/v). Als Kontrolle wurde ein Amplifikationsansatz mit Standard PCR-Puffer angesetzt. Die Analyse der Amplifikate erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Negativkontrolle ohne PCR-Vorlage; **Bahn 2:** Standard PCR-Puffer; **Bahn 3:** PCR-Puffer 7 : Puffer D; 1 : 1

Ergebnisse

Um die Inaktivierung der S1 Nuklease und die Funktion der PCR sicherzustellen, wurde diese auch bei Anwesenheit von S1 Nuklease getestet. Dazu wurden Verdauungsansätze, die 0,4 Units S1 Nuklease enthielten, 15 min bei 20 °C inkubiert. Die Ansätze enthielten zudem 10^5 Moleküle des Oligonukleotides Pos2(5) bzw. PNA/Pos2(5)-Hybride und die Oligonukleotide Pos3(5)rev und Pos4(5) zum Schutz der Primerregionen vor der Nuklease. Die Verdauungsansätze wurden nach der Inkubation in PCR-Ansätze des gleichen Volumens gegeben und auf 96 °C erwärmt, bevor die Temperaturzyklen für die Amplifikation durchlaufen wurden. Die Analyse der Amplifikationsansätze ist in Abbildung 4.32 dargestellt und zeigt lediglich bei dem Ansatz mit PNA/DNA-Hybriden ein Amplifikat. Auch bei Anwesenheit von S1 Nuklease war daher eine Amplifikation der DNA nach Komplexierung von Zn^{2+} möglich.

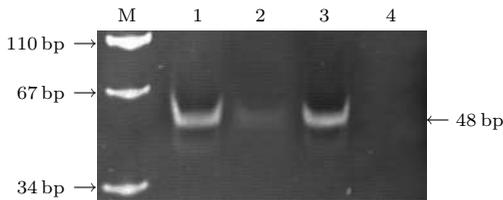


Abbildung 4.32 Test der Amplifikation in Puffer7 und Puffer D bei Anwesenheit von S1 Nuklease. Die Verdauung durch S1 Nuklease wurde in einem separaten Reaktionsgefäß vorgenommen und die Ansätze unmittelbar vor der Amplifikation vermischt (Durchführung auf Seite 192). Die Analyse der Amplifikate erfolgte in einem 15%igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Positivkontrolle ohne S1 Nuklease mit 10^5 PNA/DNA-Hybriden; **Bahn 2:** Negativkontrolle ohne PCR-Vorlage; **Bahn 3:** Ansatz mit PNA/DNA-Hybriden und 0,4 U S1 Nuklease; **Bahn 4:** Ansatz mit ssDNA und 0,4 U S1 Nuklease

Die Funktion der enzymatischen Degradierung durch S1 Nuklease wurde durch die beschriebenen Experimenten nachgewiesen. Jedoch erwies sich dieses System als wenig praktikabel für eine PNA-Sequenzanalyse, da sich auch hier Kontaminationen durch die DNA-Bibliothek als problematisch herausstellten.

Mischung zweier Pufferkompartimente ohne Eingriff in das System

Die DNA-Bibliothek, die mit der PNA hybridisiert wurde und aus der später die komplementäre DNA amplifiziert werden sollte, wurde in Konzentrationen von bis zu 1 mM gehandhabt. Aus diesem Grund stellte die Kontamination der PCR-Reagenzien mit Molekülen der Bibliothek bei Wiederholungen der

Experimente ein Problem dar. Neben Vorkehrungen, wie die räumliche Trennung der Arbeitsplätze für die Handhabung der Bibliothek und die Durchführung der PCR, wurde ein System konzipiert, bei dem der enzymatische Abbau der freien ssDNA und die Amplifikation in einem geschlossenen System stattfinden konnte. Dieses basierte auf den oben beschriebenen Puffern, die vor der Amplifikation vermischt wurden.

Um diese Ansätze ohne Eingriff in das System zu vereinfachen, wurden diese durch eine hydrophobe Schicht im Reaktionsgefäß voneinander getrennt (Abbildung 4.33). Die Zusammensetzung der Schicht wurde so gewählt, dass die Schmelztemperatur bei ca. 25 °C und damit nur leicht über der Inkubationstemperatur für die S1 Nuklease lag. Die spezifische Verdauung der nicht hybridisierten DNA fand dabei im oberen Teil statt. Vor der Amplifikation wurden die Systeme gemischt, indem die Temperatur auf 30 °C erhöht wurde.

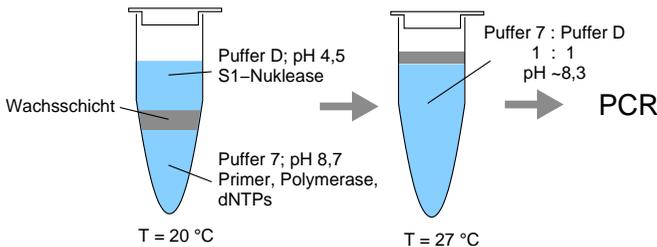


Abbildung 4.33 Darstellung der Verdauung in einem abgetrennten Kompartiment des Reaktionsgefäßes. Die beiden Puffer waren während der Inkubation bei 20 °C durch eine Wachsschicht aus Heptadecan/Paraffinwachs (25:1 (v/w)) getrennt. Im oberen Teil des Gefäßes fand die Verdauung mit S1-Nuklease statt, im unteren Teil befanden sich Primer, Polymerase und dNTPs in PCR-Puffer 7. Wurde die Temperatur auf 27 °C erhöht, verflüssigte sich die Wachsschicht und die Kompartimente vermischten sich. Durch die Komplexbildung des für die S1-Nuklease essentiellen Zn^{2+} durch das im unteren Kompartiment enthaltene EDTA und durch den resultierenden pH-Wert von 8,3 wurde die Aktivität der S1-Nuklease gesenkt, und unmittelbar danach während der Primärdenaturierung der PCR vollständig inaktiviert.

Die Funktion der Degradierung wurde in Ansätzen getestet, die 10^5 Moleküle ssDNA der Bibliothek bzw. 10^5 PNA/DNA-Hybride enthielten, die im Vorfeld hybridisiert und entsprechend verdünnt wurden. Die Ansätze enthielten 0,4 Units S1 Nuklease. Die PAGE-Analyse der Amplifikate ist in Abbildung 4.34 gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die Degradierung bei einem Hintergrund von 10^5 Molekülen ssDNA hinreichend effektiv funktioniert, da in den Ansätzen, die keine PNA enthielten, erwartungsgemäß auch kein Amplifikat erhalten wurde. Zudem war die Spezifität der S1 Nuklease ausreichend, um die DNA der PNA/DNA-Hybride nicht abzubauen.

Ergebnisse

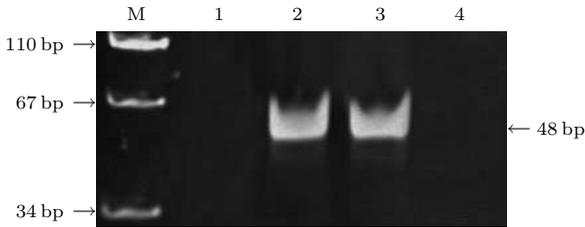


Abbildung 4.34 Evaluierung der spezifischen Hydrolyse freier ssDNA durch S1 Nuklease in einem System aus zwei Puffern, die während der Verdauung durch eine Wachsschicht getrennt waren (siehe Abbildung 4.33). Vor der PCR wurden die Kompartimente durch Erhöhung der Temperatur vermischt. Die genaue Durchführung ist auf Seite 193 beschrieben. Die Abbildung zeigt die PAGE-Analyse der Ansätze nach der Amplifikation. Die Trennung erfolgte über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Negativkontrolle ohne DNA; **Bahn 2:** Positivkontrolle ohne S1 Nuklease mit 10^5 PNA/DNA-Hybriden; **Bahn 3:** Ansatz mit 10^5 PNA/DNA-Hybriden; **Bahn 4:** Ansatz mit 10^5 Molekülen ssDNA; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI)

Da die Menge der nicht hybridisierten DNA und damit der Hintergrund erwartungsgemäß 10^5 Moleküle überstieg, wurde im weiteren Verlauf der spezifische Abbau von größeren DNA-Mengen in einem zwei Puffer System mit getrennten Kompartimenten erprobt. Dazu wurden in verschiedenen Ansätzen 10^7 bis 10^{11} Moleküle der DNA-Bibliothek ohne PNA mit 0,4 Units S1 Nuklease in das obere Kompartiment gegeben. Nach der Inkubation und der Vereinigung der Kompartimente wurde die enthaltene DNA durch PCR amplifiziert. Da in den Ansätzen keine PNA vorhanden war, um die DNA zu schützen, waren auch keine Amplifikate nach der PCR zu erwarten. Die Experimente zeigten jedoch, dass bei Verwendung von 0,4 Units S1 Nuklease bereits 10^8 Moleküle der DNA-Bibliothek nicht mehr ausreichend abgebaut werden konnten, um die Entstehung eines Amplifikates in der PCR zu unterdrücken (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher im weiteren die Menge der S1 Nuklease bei Anwesenheit von 10^8 DNA-Molekülen von 0,4 bis 1,6 Units variiert. Da auch hier keine PNA zugegeben wurde, um die DNA vor der Degradierung zu schützen, waren wiederum keine Amplifikate zu erwarten.

In Abbildung 4.35 ist ersichtlich, dass die Degradierung der PCR-Vorlage durch die S1 Nuklease im oberen Kompartiment auch bei Anwesenheit von 1,6 Units S1 Nuklease unvollständig war. Auch der Vergleich von analog behandelten Reaktionsansätzen mit 10^8 Molekülen Bibliotheks-DNA mit solchen, die 10^5 PNA/DNA-Hybride enthielten, zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Menge der PCR-Produkte (Daten nicht gezeigt).

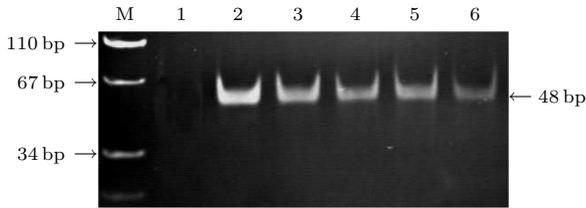


Abbildung 4.35 Analyse der Amplifikate nach Degradierung nicht hybridisierter DNA durch S1 Nuklease in einem System mit getrennten Pufferkompartimenten. Die Durchführung des Experimentes ist auf Seite 193 beschrieben. Die Analyse der Amplifikate erfolgte in einem 15 %igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Negativkontrolle ohne DNA, 0,4 U S1 Nuklease; **Bahn 2:** Positivkontrolle ohne S1 Nuklease; **Bahn 3:** 0,4 U S1 Nuklease; **Bahn 4:** 0,8 U S1 Nuklease; **Bahn 5:** 1,2 U S1 Nuklease; **Bahn 6:** 1,6 U S1 Nuklease; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI)

Der Abbau der freien ssDNA durch S1 Nuklease und die Amplifikation durch Nutzung eines Systems mit getrennten Pufferkompartimenten war ab einem Hintergrund von 10^8 Molekülen nicht mehr geeignet, was wiederholt bei Selektionsexperimenten mit randomisierter DNA-Bibliothek und 10^5 PNA Molekülen bestätigt wurde. Dies wurde auf die unzureichende Effizienz der spezifischen Degradierung der freien DNA durch die Nuklease zurückgeführt. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Arbeit alternative Methoden für die Ermittlung der Sequenz einer unbekanntem 18mer PNA entwickelt und getestet.

4.2.2.2 Spezifischer Abbau nicht hybridisierter DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die PCR für die Amplifikation der zur PNA komplementären Oligonukleotide wies aufgrund ihrer hohen Effizienz eine große Anfälligkeit für Kontaminationen bestehend aus Molekülen der DNA-Bibliothek auf. Daher sollte ein System entwickelt werden, in dem die spezifische enzymatische Degradierung und die Amplifikation der geschützten DNA durch PCR in einer „Eintopfreaktion“ stattfinden konnte. So sollte die Notwendigkeit eliminiert werden, das Reaktionsgefäß zwischen enzymatischem Abbau und Amplifikation zu öffnen, um Kontaminationen zu verhindern. Der Abbau von nicht hybridisierter DNA durch S1 Nuklease war jedoch zum einen sequenzunabhängig, so dass diese bei Anwesenheit in einem PCR-Ansatz ebenfalls die Primer degradieren würde, zum anderen stellte ein PCR-Puffer keine optimalen Bedingungen für die Funktion der S1 Nuklease dar.

Eine alternative Degradierungs-Strategie basierte daher auf der Verwendung von Restriktionsendonukleasen, die auch unter PCR-Pufferbedingungen funktionierten. Die Eigenschaft von PNA, die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu verhindern, wurde bereits beschrieben [168–172]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Typ II und Typ IIs Restriktionsendonukleasen auf ihre Eignung hin untersucht, nicht an PNA hybridisierte DNA spezifisch zu degradieren. Nach der Restriktion sollten diese thermolabilen Enzyme während der Primärdenaturierungsphase der PCR thermisch inaktiviert werden.

Abbau nicht hybridisierter DNA durch XbaI

Bei der Verwendung der Typ II Restriktionsendonuklease XbaI sollte eine in direkter Proximität zur Erkennungssequenz hybridisierte PNA aufgrund ihrer artifiziiellen Struktur die Restriktion der DNA unterbinden. Zur Erprobung dieser Strategie wurde das Oligonukleotid Pos2(XbaI)D2-1rev konstruiert, dessen mittlere Region zur PNA komplementär war und in der sich eine XbaI-Schnittstelle in der Primerregion am 3'-Ende des Oligonukleotides befand. PNA, die in der Mittelregion des Oligonukleotides hybridisierte, sollte die Restriktion in der Erkennungssequenz unterbinden. Das Prinzip ist in Abbildung 4.36 schematisch dargestellt.

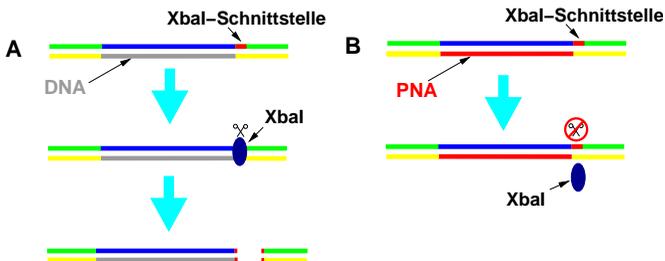


Abbildung 4.36 Degradierung der nicht an PNA hybridisierten Oligonukleotide durch XbaI. Das Oligonukleotid Pos2(XbaI)D2-1rev verfügt über eine Erkennungssequenz (rot) für die Restriktionsendonuklease XbaI in der 15 Nucleotid langen Primerregion (grün) am 3'-Ende. Zwei Oligonukleotide (gelb) hybridisieren an den Primerregionen der DNA ein weiteres (grau) in der Mittelregion. Alternativ wurde komplementäre PNA (rot) in der Mitte hybridisiert. **(A)** Befindet sich DNA in der mittleren Region, kann die Restriktionsendonuklease XbaI die DNA hydrolysieren. **(B)** Proximal zur Erkennungssequenz hybridisierte PNA ist potenziell in der Lage, die Restriktion zu unterbinden.

Um die Eignung der Restriktionsendonuklease XbaI für die spezifische Degradierung der nicht an PNA hybridisierten DNA zu testen, wurde das Oligonukleotid Pos2(XbaI)D2-1rev zusammen mit entsprechenden Oligonukleotiden, die komplementär zu den Primerregionen waren und komplementärer PNA

mit der Nuklease XbaI inkubiert. Die Ansätze wurden nach der Inkubation mittels PAGE analysiert. Die Restriktion der DNA durch die Nuklease XbaI wurde durch die PNA nicht unterbunden. Wie in Abbildung 4.37 ersichtlich ist, entstanden Fragmente mit einer Länge von 34 bp und 14 bp sowohl bei Abwesenheit, als auch bei Anwesenheit von PNA. Weiterhin war in beiden Verdauungsansätzen noch DNA der ursprünglichen Länge (48 bp) vorhanden, was auf eine unzureichende Effektivität der Nuklease hinwies.

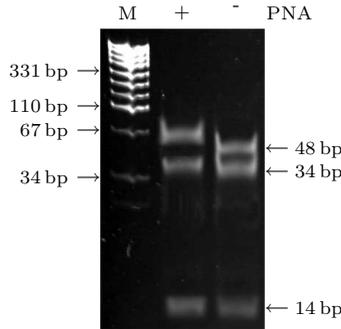


Abbildung 4.37 PAGE-Analyse der Verdauungsansätze mit der Restriktionsendonuklease XbaI nach dem Prinzip in Abbildung 4.36. Die Erkennungssequenz für XbaI lag am 3'-Ende der DNA. Die Durchführung des Experimentes ist auf Seite 193 beschrieben. Die PNA/DNA-Hybride zeigen aufgrund der elektrischen Neutralität der PNA ein höheres apparentes Molekulargewicht. Die Ansätze wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. +: Ansatz mit PNA; -: Ansatz ohne PNA; M: DNA-Standard (pUC19/MspI)

Da die Proximität der PNA nicht ausreichend war, um die Restriktion der DNA durch XbaI zu verhindern, wurde in einem weiteren Ansatz das Oligonukleotid Pos2(XbaI2)D2-1rev verwendet, in dem die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease XbaI in der Primerregion des 5'-Endes lag. Hierbei sollte die Doppelstrang-Spezifität der Restriktionsendonuklease ausgenutzt werden, um DNA spezifisch zu degradieren, die nicht an PNA hybridisiert war. Im PCR-Reaktionsansatz, in dem die Restriktion stattfinden sollte, kann der 3'-Primer von der anwesenden Polymerase nur verlängert werden, wenn keine PNA die Elongation verhindert. Aufgrund der Spezifität für dsDNA kann die Hydrolyse durch XbaI daher erst stattfinden, wenn die DNA doppelsträngig vorliegt. Der Ablauf der Reaktion ist in Abbildung 4.38 dargestellt.

Die Evaluierung dieser Strategie wurde analog zu der vorherigen durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten das Oligonukleotid Pos2(XbaI2)D2-1rev zusammen mit entsprechenden Oligonukleotiden, die komplementär zu

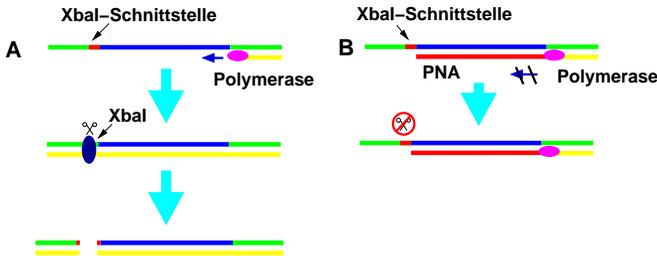


Abbildung 4.38 Degradierung der nicht an PNA hybridisierten Oligonukleotide durch XbaI. Die Primerregion (grün) am 5'-Ende der DNA-Bibliothek verfügt über eine Erkennungssequenz für die doppelstrang-spezifische Restriktionsendonuklease XbaI (rot). **(A)** Bei Abwesenheit von PNA wird der 3'-Primer (gelb) von der Polymerase verlängert. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease liegt nun doppelsträngig vor und kann hydrolysiert werden. **(B)** Befindet sich eine komplementäre PNA an der mittleren Region (blau), findet eine Verlängerung des Primers nicht statt, und die einzelsträngige Erkennungssequenz wird nicht hydrolysiert. Nach der thermischen Inaktivierung der Restriktionsendonuklease kann die DNA durch PCR amplifiziert werden.

den Endregionen waren und im Mittelbereich hybridisierende DNA bzw. PNA. Zusätzlich wurde DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase zugesetzt. Die Analyse der Verdauungsansätze in Abbildung 4.39 zeigte auch nach 9 h Inkubation vollständig intakte PNA/DNA-Hybride. Der Abbau der DNA ohne PNA war jedoch unvollständig. Daher war eine Entfernung nicht an PNA hybridisierter DNA nach diesem Verfahren nicht praktikabel.

Abbau nicht hybridisierter DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen eine meist asymmetrische Basenabfolge und hydrolysieren die DNA an einer Stelle, die außerhalb dieser liegt. Für den spezifischen Abbau von nicht an PNA hybridisierter DNA wurde die DNA-Bibliothek so konstruiert, dass die Primerregionen eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease MlyI enthielten, so dass der Ort der Hydrolyse innerhalb der randomisierten Sequenz lag, wie in Abbildung 4.40 dargestellt ist.

Die Anwesenheit einer komplementären PNA sollte die Hydrolyse der DNA unterbinden, so dass die Oligonukleotide nachfolgend amplifiziert werden konnten. Das Prinzip der spezifischen Degradierung ist schematisch in Abbildung 4.41 dargestellt.

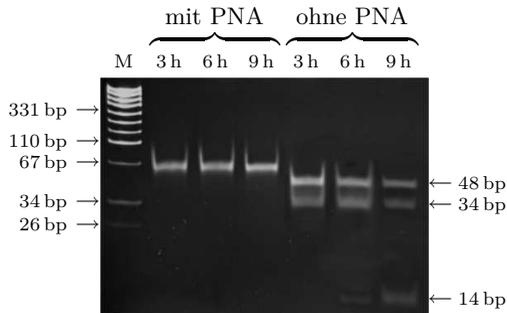


Abbildung 4.39 PAGE-Analyse der Verdauungsansätze mit der Restriktionsendonuklease XbaI nach dem Prinzip in Abbildung 4.38. Die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease XbaI lag am 5'-Ende der DNA. Die genaue Durchführung ist auf Seite 193 beschrieben. Nach Zugabe von 5 Units XbaI und 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase wurde 3h, 6h oder 9h bei 37 °C inkubiert. Die Verdauungsansätze wurden unter nativen Bedingungen auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die PNA/DNA-Hybride zeigten aufgrund der elektrischen Neutralität der PNA ein anomales Laufverhalten in der PAGE. M: DNA-Standard (pUC19/MspI)

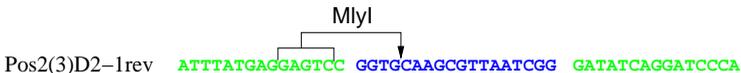


Abbildung 4.40 Schematische Darstellung der DNA-Bibliothek mit Erkennungssequenz für die Typ II's Restriktionsendonuklease MlyI in der Primerregion am 5'-Ende (blau).

Der Abbau der DNA durch Restriktionsendonukleasen des Typs II's ist im Gegensatz zu S1 oder Mungobohnen Nuklease sequenzabhängig und doppelstrang-spezifisch. Er erlaubt daher eine Degradierung nicht hybridisierter DNA einer DNA-Bibliothek in einem PCR-Ansatz und hydrolysiert weder PNA/DNA-Hybride, noch die Primer. Zunächst wurde zu diesem Zweck eine Optimierung des Puffers dahingehend durchgeführt, dass sowohl die Restriktion, als auch eine nachgeschaltete Amplifikation durch eine PCR in diesem Puffer durchführbar war. Dazu wurden verschiedene Verdauungsansätze durchgeführt, die die Oligonukleotide Pos2(3)D2-1rev (Abbildung 4.40), Pos3(3) und Pos4 enthielten. Analog zu einem PCR-Ansatz waren zusätzlich dNTPs sowie DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und die Restriktionsendonuklease MlyI enthalten. Die Reaktionen wurden in PCR-Puffer 1 und PCR-Puffer 2 durchgeführt, die jeweils mit variierenden Mengen BSA und Magnesium-Ionen versetzt wurden.

Abbildung 4.42 zeigt die Analyse der Verdauungsansätze der Pufferoptimierung für eine Restriktion mit MlyI. In PCR-Puffer 2 schien aufgrund der vollständigen Hydrolyse der DNA eine höhere Enzymaktivität gegeben zu sein.

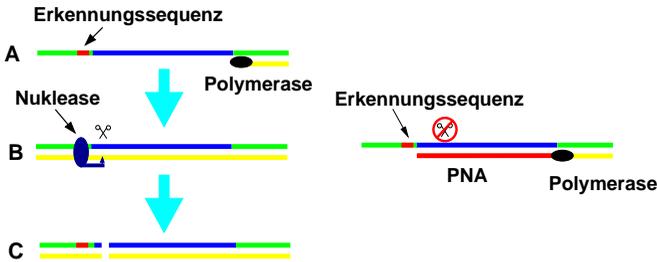


Abbildung 4.41 Schematische Darstellung der spezifischen Degradierung nicht hybridisierter DNA-Moleküle unter Verwendung von Typ II's Restriktionsendonukleasen. (A) In der Primerregion am 5'-Ende der DNA befindet sich die Erkennungssequenz. (B) Die Polymerase (schwarz) verlängert den am 3'-Ende hybridisierten Primer nur, wenn sich keine PNA in der mittleren Region befindet. (C) Die dsDNA wird dann von der Nuklease hydrolysiert.

Für weitere Experimente wurde daher PCR-Puffer 2 verwendet, der mit 5 mM Mg^{2+} -Ionen versetzt war. Eine weitere Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration schien die Effizienz der Nuklease nicht signifikant zu steigern und störte zudem bei der nachfolgenden PCR. Die BSA-Konzentration hatte nur einen marginalen Einfluss auf die Aktivität und betrug bei folgenden Experimenten daher 1 $\mu g/ml$.

Diese Pufferbedingungen stellten einen Kompromiss zwischen den optimalen Bedingungen für die MlyI-Aktivität und den Bedingungen für eine PCR dar. Die Effizienz bei Verwendung der Nuklease BseRI wurde analog getestet, war jedoch unzureichend.

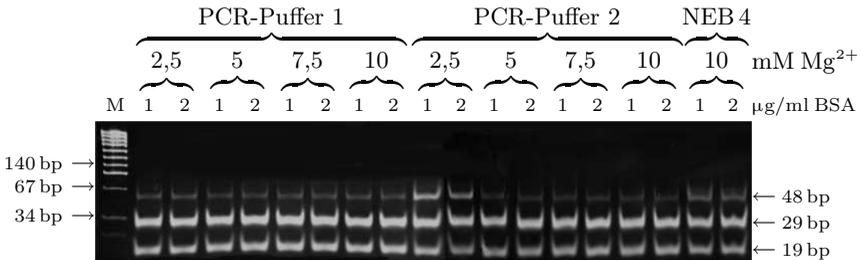


Abbildung 4.42 Analyse der Verdauungsansätze für die Pufferoptimierung bei Verwendung der Restriktionsendonuklease MlyI. Die genaue Durchführung ist auf Seite 194 beschrieben. Die oberen Klammern fassen die Ansätze mit gleichen Puffern zusammen. Die unteren Klammern ordnen die Konzentration von $MgCl_2$ in mM zu. Zum Vergleich enthielten zwei Verdauungsansätze mit 1 bzw. 2 $\mu g/ml$ BSA den für MlyI empfohlenen Puffer NEB 4. Die Auftrennung erfolgte über ein 15%-iges Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. M: DNA-Standard (pUC19/MspI)

Um zu evaluieren, ob eine komplementäre PNA die Hydrolyse durch MlyI unterbinden kann, wurden Testansätze mit dem Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev untersucht. Die Ansätze enthielten analog zu einem PCR-Ansatz die Oligonukleotide Pos3(3) und Pos4, dNTPs sowie DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und variierende Mengen der Nuklease MlyI in PCR-Puffer 2. Kontrollansätze enthielten zudem komplementäre PNA. Die Analyse der Verdauungsansätze zeigte einen Abbau der DNA durch die Restriktionsendonuklease MlyI bei Abwesenheit von PNA (Abbildung 4.43). Bei Anwesenheit einer komplementären PNA wurde die DNA vor einer Hydrolyse geschützt.

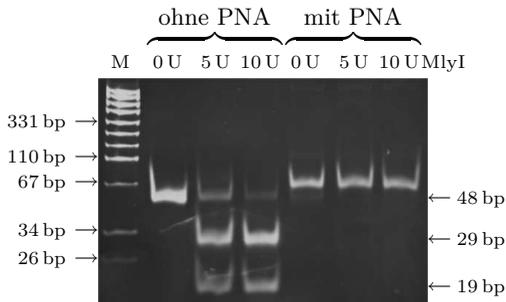


Abbildung 4.43 Analyse der Verdauungsansätze mit der Typ II Restriktionsendonuklease MlyI unter Verwendung von DNA und PNA/DNA-Hybriden und variierenden Mengen MlyI (Oberkante Gel). Das Experiment wurde wie auf Seite 194 beschrieben durchgeführt. Die Abbildung zeigt eine PAGE-Analyse unter nativen Bedingungen in einem 15%-igen Polyacrylamidgel nach 18 h Inkubation bei 37 °C. M: DNA-Standard (pUC19/MspI)

Es sollte bei weiteren Experimenten der Verdauung mit MlyI direkt eine PCR nachgeschaltet werden, um nicht degradierte DNA zu amplifizieren. Dazu wurden Ansätze hergestellt, die 10^5 bis 10^9 Moleküle des Oligonukleotides Pos2(3)D2-1rev, sowie 10 Units MlyI in einer PCR-Reaktionsmischung enthielten. Die Ansätze wurden vor der Amplifikation 18 h bei 41 °C inkubiert. Die Amplifikationsansätze wurden anschließend mittels PAGE analysiert. Die Analyse ist in Abbildung 4.44 dargestellt.

In der PAGE-Analyse der Amplifikate ist ersichtlich, dass PCR-Vorlagen bis zu einer Menge von 10^5 Molekülen von der Restriktionsendonuklease abgebaut werden konnten, so dass kein Amplifikat in der PCR erhalten wurde. Bei einer 100-fachen Menge von 10^7 Molekülen war die Degradierung nicht mehr effizient genug, so dass bereits PCR-Produkte vorhanden waren.

Um die Auswirkung von PNA bei der Verdauung mit MlyI und einer nachgeschalteten Amplifikation zu untersuchen, wurden analoge Verdauungsansätze, die 10^5 PNA/DNA-Hybride enthielten, durchgeführt. Diese bestanden

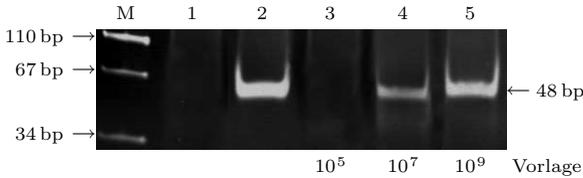


Abbildung 4.44 Analyse der Amplifikationsreaktionen nach einer vorgeschalteten Verdauung mit der Typ II Restriktionsendonuklease MlyI, die wie auf Seite 194 beschrieben durchgeführt wurde. Die Abbildung zeigt die PAGE-Analyse der Amplifikationsansätze unter nativen Bedingungen in einem 15%-igen Polyacrylamidgel. **Bahn 1:** Negativkontrolle für die PCR; **Bahn 2:** Positivkontrolle, 10⁵ Moleküle der Vorlage, kein MlyI; **Bahn 3:** 10⁵ Moleküle der Vorlage, 10 U MlyI; **Bahn 4:** 10⁷ Moleküle der Vorlage, 10 U MlyI; **Bahn 5:** 10⁹ Moleküle der Vorlage, 10 U MlyI; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI)

aus dem Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev und PNA und wurden separat hybridisiert und entsprechend verdünnt. Um einen abzubauenen Hintergrund zu simulieren, wurden zusätzlich 10⁵ bis 10⁷ Moleküle der DNA-Bibliothek Pos2(3) zugegeben, die über eine randomisierte Sequenz verfügten. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne PNA. Die Durchführung erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Experiment aus Abbildung 4.45. Es ist ersichtlich, dass bis zu einem Hintergrund bestehend aus 10⁶ Molekülen der DNA-Bibliothek eine deutlicher Unterschied zwischen Ansätzen mit und ohne PNA zu erkennen ist. 10⁷ DNA-Moleküle konnten jedoch nicht mehr ausreichend abgebaut werden, so dass auch bei dem Ansatz ohne PNA ein Amplifikat erhalten wurde.

Da der Hintergrund bei der Hybridisierung von PNA-Molekülen mit einer DNA-Bibliothek erwartungsgemäß höher war als 10⁷ DNA-Moleküle, war auch diese Methode für die effiziente Degradierung nicht anwendbar.

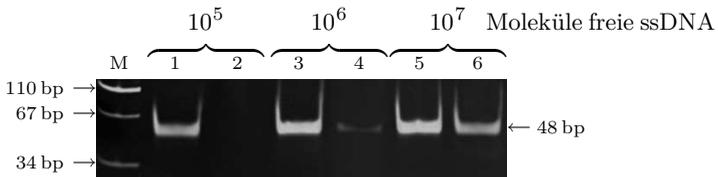


Abbildung 4.45 Analyse der Amplifikationsreaktionen nach einer vorgeschalteten Verdauung mit der Typ II Restriktionsendonuklease MlyI bei Anwesenheit von PNA/DNA-Hybriden. Die Durchführung ist auf Seite 194 beschrieben. Die Abbildung zeigt die PAGE-Analyse der Amplifikationsansätze unter nativen Bedingungen in einem 15%-igen Polyacrylamidgel. **Bahn 1:** 10⁵ Moleküle Pos2(3), 10⁵ PNA/DNA-Hybride; **Bahn 2:** 10⁵ Moleküle Pos2(3), keine PNA; **Bahn 3:** 10⁶ Moleküle Pos2(3), 10⁵ PNA/DNA-Hybride; **Bahn 4:** 10⁶ Moleküle Pos2(3), keine PNA; **Bahn 5:** 10⁷ Moleküle Pos2(3), 10⁵ PNA/DNA-Hybride; **Bahn 6:** 10⁷ Moleküle Pos2(3), keine PNA; **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI)

4.2.3 Identifizierung von PNA durch Synthese komplementärer DNA

Die Sequenzierung der PNA durch Hybridisierung einer komplementären DNA aus einer Bibliothek erwies sich in vorangegangenen Versuchen als nicht durchführbar, da eine hinreichend effiziente Isolierung der PNA/DNA-Hybride weder mittels physikalischer Methoden, noch durch eine nachgeschaltete enzymatische Degradierung der nicht komplementären DNA durchführbar war. Eine weitere Strategie zur Ermittlung der Sequenz einer 18mer PNA bestand daher aus der Synthese einer zur PNA komplementären DNA. Diese sollte sequenzspezifisch aus kleineren DNA-Fragmenten aufgebaut werden, wobei die PNA als Vorlage dienen sollte. Für die Ligation der DNA wurden zunächst chemische Reaktionen evaluiert. Bei den für die chemische Ligation von DNA eingesetzten Aktivierungsreagenzien, wie EDC und insbesondere Cyanogenbromid handelte es sich jedoch um sehr reaktive Verbindungen, die neben der gewünschten Kopplung der Oligonukleotide ebenfalls zu verschiedenen Nebenreaktionen sowohl an der DNA als auch an der PNA führen konnten. Um schonendere und spezifischere Ligationsverfahren zu finden, sollte weiterhin die Möglichkeit evaluiert werden, DNA mit Hilfe von Ligasen an einer PNA-Vorlage enzymatisch zu verknüpfen.

Um die Eignung der Ligationsmethoden für DNA an einer PNA-Vorlage zu testen, wurden zwei Oligomere mit einer Länge von 24 Nukleotiden, die jeweils mit neun Nukleotiden auf der 18mer PNA hybridisierten unter Verwendung von Cyanogenbromid, EDC oder verschiedenen Ligasen verknüpft. Das erwartete Ligationsprodukt hatte somit eine Länge von 48 Nukleotiden von denen 18 komplementär zur PNA waren. Diese wurden von Überhängen flankiert, die aus jeweils 15 Nukleotiden bestanden und als Primerregionen für eine spätere Amplifikation dienen sollten. Die Oligonukleotide waren an einem oder an beiden aneinander liegenden Enden phosphoryliert. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 4.46 dargestellt.



Abbildung 4.46 Zwei 24mer Oligonukleotide hybridisierten jeweils mit neun Nukleotiden (blau) an der Vorlage (grau). Inkubation mit Cyanogenbromid oder EDC als Kopplungsreagenzien führte zu einer Ligation der DNA. In den Reaktionen wurden verschiedene Kombinationen der Phosphorylierung für die in direkter Proximität liegenden DNA-Enden (X bzw. Y) getestet. Die Überhänge (grün) mit einer Länge von 15 Nukleotiden dienten als Primerregionen für eine nachfolgende Amplifikation der Ligationsprodukte.

Um eine ausreichende Hybridisierung der beiden Oligonukleotide an der PNA zu gewährleisten und die Reaktionstemperaturen entsprechend zu wählen, wurden zunächst Schmelzkurven für die Oligonukleotide an der PNA aufgenommen. Dazu wurde die optische Dichte bei 260 nm zweier Gemische aus je einem 9mer Oligonukleotid und der PNA bei verschiedenen Temperaturen gemessen (Abbildung 4.47). Diese betragen 37,7 °C bzw. 27,2 °C. Obwohl sich die Schmelztemperaturen um 10,5 °C unterschieden, konnte davon ausgegangen werden, dass auch das Oligonukleotid mit der geringeren Schmelztemperatur bei den gewählten Reaktionstemperaturen von < 25 °C zu ausreichenden Anteilen hybridisierte.

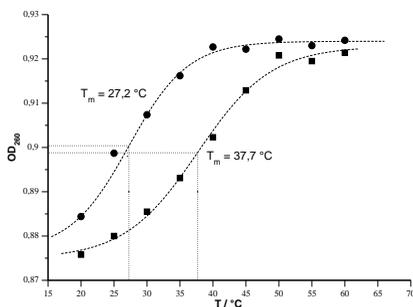


Abbildung 4.47 Schmelzkurven einer PNA und zweier komplementärer Nonamere. Die Oligonukleotide hatten die Sequenzen (**Quadrate**) 5'-GGT GCA AGC-3' und (**Kreise**) 5'-GTT AAT CGG-3'. Die Schmelzkurven wurden in 2,5 mM NaH₂PO₄, pH 7 in einem Photometer mit temperierbarer Küvettenhalterung aufgenommen. Die Konzentrationen der Oligonukleotide und der PNA betragen jeweils 2,3 μM. Die Schmelztemperaturen der beiden Oligonukleotide im PNA/DNA-Hybrid betragen 37,7 °C bzw. 27,2 °C.

4.2.3.1 Chemische Ligation mit EDC

Die Ligation von DNA mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC wurde unter Verwendung von Oligonukleotiden durchgeführt, bei denen entweder beide aneinander liegenden Enden mit einer Phosphorylierung versehen waren (Phosphorylierung an X- und Y-Position, Abbildung 4.46), oder ausschließlich das 3'-Ende (X-Position) [173]. Es wurden für beide Kombinationen Reaktionen durchgeführt, die entweder DNA, PNA oder keine Vorlage enthielten. In Abbildung 4.48 ist die PAGE-Analyse der Ligationsprodukte dargestellt. Sie zeigt eine deutliche Menge des Ligationsproduktes bei Ansätzen, in denen eine DNA-Vorlage enthalten war, wobei eine Phosphorylierung an beiden Enden die Ausbeute zu steigern schien. In Ansätzen ohne Vorlage oder mit einer PNA-Vorlage wurden jedoch keine detektierbaren Mengen des Produktes erhalten.

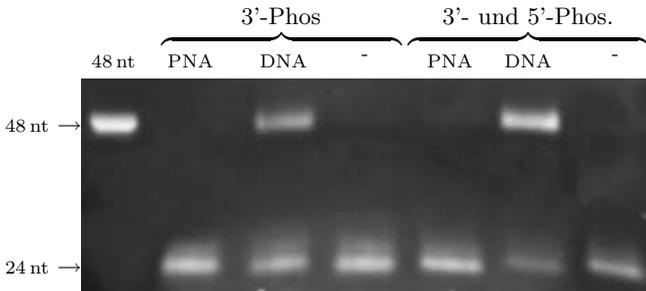


Abbildung 4.48 Ligation zweier 24mer Oligonucleotide mit EDC. Ansätze mit einem Volumen von 50 μ l enthielten jeweils 100 pmol der Oligonucleotide ApPos2(5) (5'-Phos.) und BPos2(5), bzw. ApPos2(5) und pBPos2(5) (3'-Phos.) und gegebenenfalls 100 pmol der Vorlage (DNA oder PNA) in 100 mM MES/NaOH-Puffer (pH 6) mit 20 mM $MgCl_2$. Die Ansätze wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf 10 °C abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 0,4 M EDC-Lösung initiiert. Nach 19 h Inkubation wurden die Ansätze in einer PAGE über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. **PNA**: mit PNA Vorlage; **DNA**: mit DNA-Vorlage; -: ohne Vorlage

4.2.3.2 Chemische Ligation mit Cyanogenbromid

Um eine Ligation der DNA mit Cyanogenbromid zu etablieren [174], befanden sich Phosphatgruppen am 3'-Ende (X) oder alternativ am 5'-Ende (Y) der Oligonucleotide (Abbildung 4.46). Es wurde die Eignung von PNA und DNA als Vorlage, sowie der Einfluss von Mg^{2+} -Ionen auf die Reaktion evaluiert. Die Ligationsansätze enthielten die Oligonucleotide ApPos2(5) (3'-phosphoryliert) und BPos2(5) bzw. APos2(5) und pBPos2(5) (5'-phosphoryliert) sowie 18mer PNA oder das Oligonucleotid D2-1 als Vorlage.

Die PAGE Analyse der Ligationsprodukte ist in Abbildung 4.49 dargestellt. Bei der Verwendung eines 5'-phosphorylierten Oligonucleotides konnte nur bei den Ansätzen, die DNA als Vorlage enthielten ein Ligationsprodukt nachgewiesen werden. Bei der Ligation von 3'-phosphorylierter DNA waren Ligationsprodukte der erwarteten Länge sowohl bei den Ansätzen mit DNA-, als auch bei denen mit PNA-Vorlage vorhanden. Bei den Ansätzen ohne Vorlage waren die Ausbeuten signifikant geringer. $MgCl_2$ schien lediglich bei der Verwendung von DNA-Vorlagen einen Einfluss zu haben, jedoch war es offenbar für die Ligation nicht essentiell. Es wurden bei keinem Ansatz Ligationsprodukte nachgewiesen, die länger als 48 Nucleotide waren.

Um den Einfluss des pH-Wertes bei der chemischen Ligation mit Cyanogenbromid zu ermitteln, wurde die chemische Kopplungsreaktion bei einem pH-Wert von 6 mit 20 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Ausführung und die Analyse erfolgte analog zu der vorangegangenen Ligation mit Cyanogenbromid.

Ergebnisse

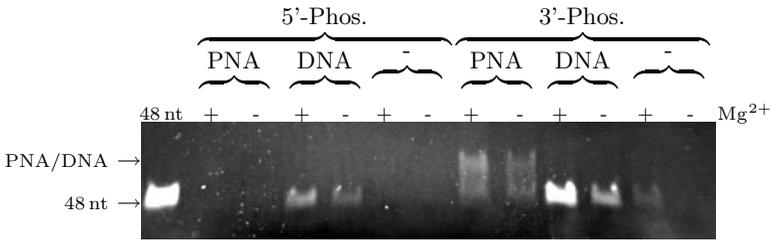


Abbildung 4.49 Analyse der Produkte nach Ligation zweier 24mer Oligonukleotide an verschiedenen Vorlagen mit Cyanogenbromid bei pH 7,5, wie auf Seite 195 beschrieben. Die Ligationsprodukte wurden in einer PAGE über ein 15%-iges Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. Bei Ansätzen mit PNA waren aufgrund der unvollständigen Denaturierung Doppelbanden im Gel vorhanden. **PNA:** mit PNA-Vorlage; **DNA:** mit DNA-Vorlage; -: ohne Vorlage

Es wurden wiederum Oligonukleotidpaare verwendet, die komplementär zur PNA waren und von denen eines eine Phosphatgruppe entweder am 5'- oder am 3'-Ende trug. Die PAGE-Analyse ist in Abbildung 4.50 dargestellt.

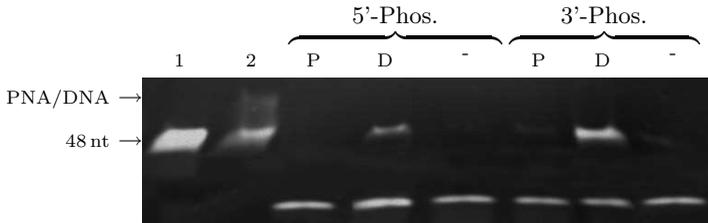


Abbildung 4.50 Ligation zweier 24mer Oligonukleotide mit Cyanogenbromid bei einem pH-Wert von 6. Die Durchführung ist auf Seite 195 aufgeführt. Die Ligationsprodukte wurden in einer PAGE über ein 15%-iges Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. **Bahn 1:** 48 nt ssDNA; **Bahn 2:** PNA/DNA-Hybrid; **P:** mit PNA-Vorlage; **D:** mit DNA-Vorlage; -: ohne Vorlage

Es ist ersichtlich, dass die Ausbeute bei Anwesenheit von PNA als Vorlage im Vergleich zu der Reaktion bei pH 7,5 wesentlich geringer war, so dass hier kein Ligationsprodukt detektiert werden konnte. Dies ist möglicherweise auf die geringere Reaktivität des Cyanogenbromides bei kleineren pH-Werten zurückzuführen. Daher wurde die Kopplungsreaktion bei einem pH-Wert von 8 wiederholt, wobei jedoch keine signifikante Erhöhung der Ausbeute im Vergleich zu der Reaktion bei pH 7,5 erhalten wurde. Aus diesem Grund wurden die folgenden Kopplungsreaktionen unter Verwendung von Cyanogenbromid bei pH 7,5 durchgeführt.

Ligation randomisierter Oligonukleotide mit Cyanogenbromid

Die chemische Ligation sollte im weiteren Verlauf der Untersuchungen genutzt werden, um zwei PNA-komplementäre Oligonukleotide aus einer DNA-Bibliothek auf der PNA vorlagenspezifisch zu verknüpfen, um so die PNA-Sequenz zu ermitteln. Da die Ligation mit Cyanogenbromid höhere Ausbeuten unter Verwendung von PNA-Vorlagen lieferte und zudem nur wesentlich kürzere Reaktionszeiten benötigte, wurde für weitere Experimente diese Ligationsmethode benutzt. Dazu wurden zwei Oligomere verwendet, die Primerregionen aus 15 Nukleotiden, sowie einen randomisierten Bereich aus 9 Monomeren besaßen, der jeweils an der PNA hybridisieren sollte (siehe Abbildung 4.46). Da der randomisierte Bereich der beiden Fragmente neun Nukleotide umfasste, sank die Diversität der möglichen Sequenzkombinationen von $6,87 \times 10^{10}$ auf 262.144, wodurch die Anzahl der zur PNA komplementären Oligonukleotide im Reaktionsansatz verglichen mit einer randomisierten Sequenz mit einer Länge von 18 nt drastisch erhöht werden konnte. Die Reaktionsansätze enthielten $2,3 \times 10^7$ PNA-Moleküle in $10 \mu\text{l}$ und die Oligonukleotide in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Statistisch lagen so die passenden DNA-Fragmente äquimolar zu den PNA-Molekülen vor. Die PNA/DNA-Hybride wurden in Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßen immobilisiert und nach Entfernung nicht hybridisierter DNA-Fragmente chemisch ligiert. Die Amplifikation erfolgte danach durch PCR im selben Reaktionsgefäß. Die erwartete Länge der Produkte betrug 48 bp. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne PNA-Vorlage hergestellt und analog behandelt. In diesem Fall waren keine Amplifikate zu erwarten, da zum einen die Ausbeute der Ligation ohne Vorlage geringer sein sollte, zum anderen konnten die entstandenen DNA-Fragmente ohne PNA nicht an einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche immobilisiert werden. In Abbildung 4.51 ist die PAGE-Analyse der PCR-Produkte dargestellt. Der Ansatz der Ligation ohne Vorlage zeigte ebenfalls Amplifikate, die jedoch nicht die erwartete Länge aufwiesen. Es handelte sich hierbei um amplifizierte Nebenprodukte der Ligation oder unspezifische Amplifikate.

Das Amplifikat mit einer Länge von 48 bp (Abbildung 4.51, Bahn 2) wurde aus dem Polyacrylamidgel eluiert und mittels einer sekundären PCR amplifiziert, um die Fragmente subklonieren und sequenzieren zu können. Die Sequenzen der Klone sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Anzahl der Nukleotide zwischen den Primerregionen (grau) variiert, was auf eine Degradierung der DNA durch das Cyanogenbromid vor der Ligation hinweist. Bei 10 sequenzierten Klonen aus zwei unabhängigen Ligationsansätzen sind Konsensussequenzen zu finden (grün). Alle Klone weisen einen homologen Abschnitt von sieben Nukleotiden auf, die bei einer parallelen Hybridisierung komplementär zur PNA wären. Diese Orientierung ist jedoch bei der Hybridisierung

Ergebnisse

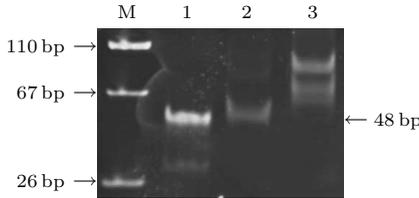


Abbildung 4.51 Ligation zweier partiell randomisierter 24mer Oligonukleotide mit Cyanogenbromid und anschließender Amplifikation der Ligationsprodukte, wie auf Seite 195 beschrieben. Die PCR-Produkte wurden in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen aufgetrennt. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1:** 48 bp Referenz-DNA; **Bahn 2:** mit PNA-Vorlage im Ligationsansatz; **Bahn 3:** ohne Vorlage im Ligationsansatz.

von DNA an PNA ungünstig.

Klon	Sequenz 5' – 3'
Klon 1a	ATTCTATCAGGATC--ACACCCACCGCC CAACAACAGCAATTA TGTAA-----CCATAGGATAGATCG
Klon 2a	ATTCTATCAGGATC-----AAGCGGCC CAACAACAGCAATTA T-TAATAGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 3a	ATTCTATCAGGATC-----AGCACA CAACAACAGCAATTA TGTAA-----CCATAGGATAGATCG
Klon 4a	ATTCTATCAGGATC-----ATCCAACG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 5a	ATTCTATCAGGATC-----ATCCAACG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 1b	ATTCTATCAGGATC-----GGTCAGG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 2b	ATTCTATCAGGATC-----GCGAGCAG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGGA---CCATAGGATAGATCG
Klon 3b	ATTCTATCAGGATC-----GCGAGCAG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 4b	ATTCTATCAGGATC-TGGCAGCTCAAG CAACAACAGCAATTA TGTAATAGGG---CCATAGGATAGATCG
Klon 5b	ATTCTATCAGGATC-----GGTCAGG CAACTACAGCAATTA TGT-ATAGGG---CCATAGGATAGATCG
PNA	-----N-Term-----CCG ATTAACG CTTGACC-----C-Term-----

Tabelle 4.1 Sequenzen der Amplifikate aus der Ligation mit Cyanogenbromid. Die sequenzierte DNA stammte aus zwei unabhängigen Reaktionen. Die Primerregionen sind grau dargestellt. Alle Klone weisen eine 20 bis 25 bp lange Konsensussequenz (grün/rot) auf, in der eine Basenabfolge von sieben Nucleotiden (rot) einem komplementären Abschnitt der PNA bei paralleler Hybridisierung entspricht. In der letzten Zeile der Tabelle ist die Sequenz der PNA dargestellt.

Die Experimente zeigten, dass eine chemische Ligation von DNA an PNA-Vorlagen möglich ist. Die Ausbeuten und die Spezifität der Ligationen an der Vorlage konnten jedoch auch durch die Veränderung verschiedener Parameter nicht signifikant und reproduzierbar gesteigert werden. Auch die Nebenreaktionen und die offenbar damit verbundene Degradierung der DNA durch das

Aktivierungsreagenz Cyanogenbromid stellte einen Nachteil dieser Methode dar, so dass diese für die Ermittlung einer PNA-Sequenz ebenfalls ungeeignet erschien.

4.2.3.3 Ligation mit doppelstrang-spezifischen Ligasen

Da die Synthese von DNA an einer PNA-Vorlage durch chemische Verknüpfung von Fragmenten in vorangegangenen Versuchen nicht effizient genug war, um eine PNA-Sequenzierung durchzuführen, wurden im Folgenden trotz der artifiziellen Struktur der PNA enzymatische Ligationsmethoden evaluiert. Diese erlaubten mildere Reaktionsbedingungen und längere Inkubationszeiten.

Ligation mit T4 DNA Ligase

Zunächst sollte evaluiert werden, ob T4 DNA Ligase in der Lage ist, Einzelstrangbrüche der DNA in DNA/PNA-Hybriden zu schließen. Dazu wurden analog zu vorhergehenden Versuchen 24mer Oligonukleotide verwendet, die mit jeweils 9 Nukleotiden an der PNA hybridisierten, wie in Abbildung 4.46 auf Seite 105 dargestellt ist. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine DNA-Vorlage verwendet, die eine der PNA analoge Sequenz besaß. Entsprechend der Substratspezifität der Ligase war jeweils das 5'-Ende der aneinander liegenden DNA-Enden phosphoryliert. In Abbildung 4.52 ist zu erkennen, dass ein Ligationsprodukt mit einer Länge von 48 Nukleotiden nur bei Anwesenheit einer DNA-Vorlage entstanden ist. Wie bei der Spezifität der T4 DNA Ligase zu erwarten war, fand keine Ligation der einzelsträngigen DNA ohne Vorlage statt. Ebenso war das PNA/DNA-Hybrid nicht als Substrat geeignet.

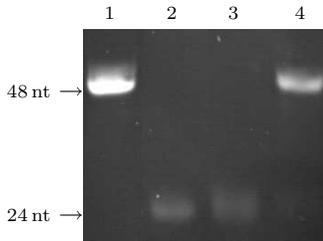


Abbildung 4.52 Ligation zweier 24mer Oligonukleotide an PNA- bzw. DNA-Vorlagen mit T4 DNA Ligase wie auf Seite 196 beschrieben. Die Ansätze wurden in einer denaturierenden PAGE über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. **Bahn 1:** 48 nt ssDNA; **Bahn 2:** Ligation mit PNA-Vorlage; **Bahn 3:** Ligation ohne Vorlage; **Bahn 4:** Ligation mit DNA-Vorlage.

Ligation mit *Taq* DNA Ligase

Weiterhin sollte *Taq* DNA Ligase für die Verknüpfung zweier Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage verwendet werden. In Analogie zu vorangegangenen

Versuchen wurden PNA- und DNA-Vorlagen, sowie zwei 24mer Oligonukleotide verwendet, die mit jeweils neun Nukleotiden an die Vorlagen hybridisierten (Abbildung 4.46; Seite 105). Die Abbildung 4.53 zeigt die PAGE-Analyse der Ligationsansätze. Es ist ersichtlich, dass nur Oligonukleotide an einer DNA-Vorlage ligiert werden konnten. Weder in den Ansätzen, die PNA als Vorlage enthielten, noch in denen ohne Vorlage konnten Ligationsprodukte detektiert werden.

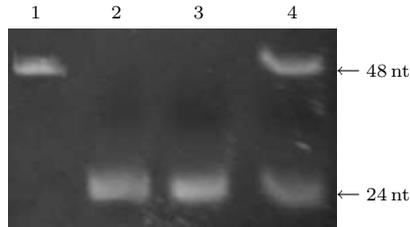


Abbildung 4.53 Ligation zweier 24mer Oligonukleotide an PNA- bzw. DNA-Vorlagen mit *Taq* DNA Ligase. Die Durchführung ist auf Seite 196 beschrieben. Die Ansätze wurden in einer denaturierenden PAGE über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. **Bahn 1:** 48 nt ssDNA; **Bahn 2:** mit PNA-Vorlage; **Bahn 3:** ohne Vorlage; **Bahn 4:** mit DNA-Vorlage.

4.2.3.4 Ligation mit T4 RNA Ligase

Die Versuche mit doppelstrang-spezifischen Ligasen zeigten, dass PNA/DNA-Hybride kein Substrat für diese Enzyme darstellten. Daher sollte im weiteren Verlauf getestet werden, ob die einzelstrang-spezifische T4 RNA Ligase für die Ligation von DNA auf PNA-Vorlagen verwendet werden kann.

Ligation zweier ssDNA-Fragmente

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, in denen Oligodesoxynukleotide an einer PNA-Vorlage mit T4 RNA Ligase verknüpft werden sollten. Dafür wurden wiederum zwei 24mer Oligonukleotide verwendet, wobei DNA oder PNA als Vorlage diente (Abbildung 4.46; Seite 105). Aufgrund der Spezifität für einzelsträngige Nucleinsäuren war die T4 RNA Ligase nicht in der Lage, Oligonukleotide zu verknüpfen, die an einer DNA-Vorlage hybridisierten (Abbildung 4.54; Bahn 2). Weiterhin war die Ausbeute der Ligation ohne Ligationvorlage bei den gewählten Reaktionsbedingungen so gering, dass in der PAGE-Analyse kein Ligationsprodukt detektiert werden konnte (Bahn 3). Es gelang jedoch, Oligonukleotide, die an eine PNA hybridisierten mittels T4

Ergebnisse

RNA Ligase zu verknüpfen, wodurch eine 48 nt lange ssDNA in detektierbaren Mengen entstand (Bahn 1).

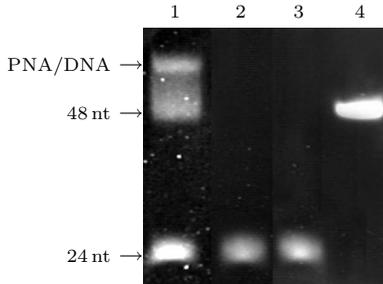


Abbildung 4.54 Ligation zweier 24mer Oligonukleotide an PNA- und DNA-Vorlagen mit T4 RNA Ligase. Die Durchführung der Ligation ist der Beschreibung auf Seite 196 zu entnehmen. Die Ansätze wurden in einer denaturierenden PAGE über ein 15 %-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. **Bahn 1:** Ligation mit PNA-Vorlage; **Bahn 2:** Ligation mit DNA-Vorlage; **Bahn 3:** Ligation ohne Vorlage; **Bahn 4:** 48 nt ssDNA.

Ligation und anschließende Amplifikation der Ligationsprodukte

Für eine PNA-Sequenz-Analyse mussten die Ligationsprodukte amplifiziert werden. Analog zu dem vorangegangenen Versuch wurden daher zwei 24mer Oligonukleotide ligiert und die entstandene DNA amplifiziert. Es sollte so eruiert werden, wie groß der Hintergrund durch unspezifisch ligierte Fragmente bei einer Ligation war. Idealerweise sollte die Spezifität so hoch sein, dass Amplifikate lediglich bei Anwesenheit von PNA-Vorlagen erhalten werden. Dazu wurden entsprechende Oligonukleotide zunächst in einem Ligationsansatz mit der PNA hybridisiert und durch Zugabe von T4 RNA Ligase verknüpft. Parallel wurden Kontrollansätze hergestellt, die keine PNA enthielten. Nach der Ligation wurden die Reaktionsmischungen in Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße überführt und inkubiert, um die PNA/DNA-Hybride über die Biotingruppe an der PNA zu immobilisieren. Nach dem Waschen der Reaktionsgefäße wurden PCR-Reaktionsmischungen in diese gegeben und die DNA amplifiziert. Die Amplifikate wurden in einer PAGE analysiert, die in Abbildung 4.55 dargestellt ist. Dort ist ersichtlich, dass auch in Abwesenheit der PNA Amplifikate erhalten wurden, was auf eine zu große Menge unspezifisch ligierter DNA-Fragmente und deren unzureichende Entfernung beim Waschen zurückgeführt wurde.

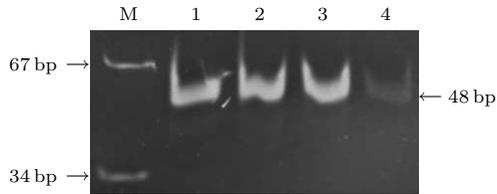


Abbildung 4.55 Analyse der Amplifikate nach Hybridisierung zweier Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage und anschließender Ligation mit T4 RNA Ligase im Hybridisierungsansatz, wie auf Seite 196 beschrieben. Nach der Immobilisierung der PNA/DNA-Hybride erfolgte die Amplifikation der Ligationsprodukte durch PCR. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1 und 2:** Ansätze mit PNA-Vorlage; **Bahn 3:** Kontrollansatz ohne PNA-Vorlage; **Bahn 4:** Negativkontrolle für PCR.

Im folgenden Experiment wurde daher die Ligation der Fragmente nach der Immobilisierung der PNA/DNA-Hybride durchgeführt. Hier war jedoch die Ligation aufgrund der behinderten Diffusion sowohl der Ligase als auch des Substrates eingeschränkt. Weiterhin war die Hybridisierung der Fragmente vor der Ligation, die sich nur über neun Nukleotide erstreckte labiler, als nach der Ligation mit 18 Nukleotiden, so dass die Verluste der komplementären DNA beim Waschen höher anzusetzen waren. Dessen ungeachtet wurden Amplifikate wie erwartet lediglich in den Ansätzen mit PNA erhalten, was auf eine hinreichende Spezifität der Ligation hindeutete (Abbildung 4.56).



Abbildung 4.56 Nach Hybridisierung zweier Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage erfolgte die Immobilisierung der Hybride aus zwei DNA-Oligomeren und einer PNA. Nach Entfernung der nicht hybridisierten DNA durch Waschen wurde die Ligation der DNA mit T4 RNA Ligase und anschließend eine Amplifikation der Ligationsprodukte vorgenommen. Die Durchführung ist der Seite 197 zu entnehmen. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1 und 2:** Ansätze mit PNA-Vorlage; **Bahn 3:** Kontrollansatz ohne PNA-Vorlage; **Bahn 4:** Negativkontrolle für PCR.

Ligation partiell randomisierter ssDNA-Fragmente

Ein Ansatz zur Ermittlung der PNA-Sequenz auf Basis einer enzymatischen Ligation bestand in der Verknüpfung zweier partiell komplementärer Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage. Diese sollten nach Inkubation der PNA mit einer entsprechenden DNA-Bibliothek an die PNA hybridisieren und sequenzspezifisch mit T4 RNA Ligase ligiert werden. Diese Oligomere besaßen Primerregionen aus 15 Nukleotiden, sowie einen randomisierten Bereich aus 9 Monomeren, der jeweils komplementär zu Teilen der PNA sein sollte. Die Reaktionsansätze enthielten wiederum $2,3 \times 10^7$ PNA-Moleküle in $10 \mu\text{l}$ und die Oligonukleotide in einer Konzentration von jeweils $1 \mu\text{M}$. Dies gewährleistete, dass die passenden DNA-Fragmente aus der Bibliothek statistisch äquimolar zu den PNA-Molekülen vorlagen. Die Ansätze wurden erwärmt und abgekühlt. Danach wurden die Hybride aus PNA und zwei komplementären Oligonukleotiden in Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßen immobilisiert und nach Entfernung der nicht hybridisierten DNA-Fragmente durch Waschen mit T4 RNA Ligase ligiert. Die Amplifikation erfolgte danach durch eine PCR im selben Reaktionsgefäß. Die erwartete Länge der Produkte betrug 48 bp. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne PNA-Vorlage hergestellt und analog behandelt. In diesem Fall waren keine Amplifikationsprodukte zu erwarten, da zum einen die Ausbeute der Ligation ohne Vorlage geringer sein würde, zum anderen konnten die entstandenen DNA-Fragmente ohne PNA nicht an einer Streptavidin beschichteten Oberfläche immobilisiert werden. In Abbildung 4.57 ist die PAGE-Analyse der Amplifikate dargestellt. Der PCR-Ansatz der Ligation ohne Vorlage zeigte ebenfalls Amplifikate. Diese waren jedoch schwächer als die, der Ansätze mit PNA. Es handelte sich hierbei um amplifizierte Kontaminationen oder unspezifisch ligierte DNA, die durch Waschen nicht entfernt werden konnte.

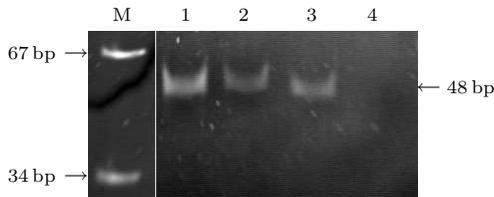


Abbildung 4.57 Ligation zweier partiell randomisierter Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage mit T4 RNA Ligase und anschließender Amplifikation der Ligrationsprodukte, wie auf Seite 197 beschrieben. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1 und 2:** Ansätze mit PNA-Vorlage; **Bahn 3:** Kontrollansatz ohne PNA-Vorlage; **Bahn 4:** Negativkontrolle für PCR

Die DNA aus dem Ansatz, der PNA enthielt (Abbildung 4.57, Bahn 1) wurde in Plasmid-DNA subkloniert und monoklonalisiert. Vor der Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mittels einer Multiplex-PCR kontrolliert, wobei im Falle einer richtigen Sequenz zwei Amplifikate erhalten werden sollten, wie in Abbildung 4.58 dargestellt. Wie in Abbildung 4.59 ersichtlich ist, wies kein PCR-Ansatz zwei Amplifikate auf, wie es bei einer Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz der Fall wäre.

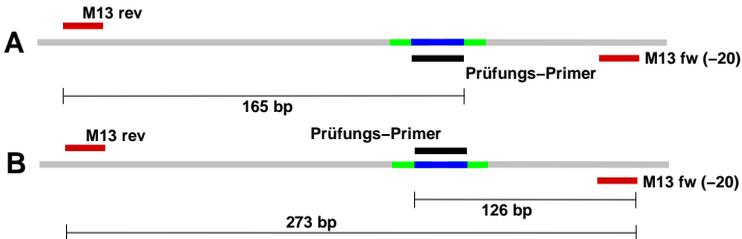


Abbildung 4.58 Darstellung der Multiplex-PCR zur Überprüfung der Klone. Der PCR-Ansatz enthielt drei Primer. Die Primer M13rev und M13fw(-20) (rot) hybridisierten vor bzw. hinter der Klonierungsstelle des Plasmids. Der dritte Primer (schwarz) hybridisierte an dem subklonierten Amplifikat, wenn es die erwartete Sequenz (blau) enthielt. War dies der Fall, so entstanden zwei Amplifikate mit unterschiedlicher Länge, was von der Orientierung der subklonierten DNA abhing. Die PCR gab so Aufschluss über die Anwesenheit und die Länge eingefügter DNA im Plasmid und über deren Orientierung und der Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz.

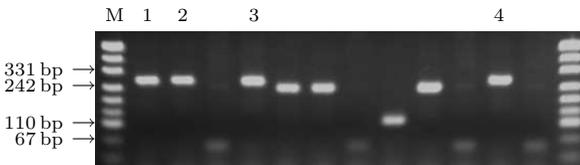


Abbildung 4.59 Klonkontrolle durch PCR nach Ligation von partiell randomisierten Oligonukleotiden an einer PNA-Vorlage durch T4 RNA Ligase und Amplifikation der Ligationsprodukte. Die Amplifikate wurden in das Plasmid pZero kloniert. Als Prüfungs-Primer wurde das Oligonukleotid D2-1 verwendet. Vier ausgewählte Klone wurden sequenziert.

Um zu evaluieren, ob die erhaltenen Sequenzen partiell mit der erwarteten übereinstimmten, was beispielsweise bei der Hybridisierung eines einzelnen richtigen Oligonukleotides der Fall wäre, was durch PCR nicht zu ermitteln war, wurden vier Klone sequenziert, die eingefügte DNA enthielten, obwohl sie jedoch kein zweites Amplifikat aufwiesen, wie es bei einer vollkommenen Übereinstimmung der Sequenz mit der PNA zu erwarten war. Die erhaltenen

Sequenzen der Klone sind aus Tabelle 4.2 zu entnehmen. Weder eine Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz noch eine Sequenzhomologie der Klone untereinander konnte festgestellt werden. Dies weist auf eine Kontamination der Amplifikationreaktionen durch unspezifisch ligierte und nicht entfernte DNA hin.

Klon	Sequenz 5'–3'
Klon 1	ATTCTATCACGAGTC--CTACCAGTC-CGGAGACAC--GCTGATGGTAAGCTA
Klon 2	ATTCTATCACGAGTC--CAATTACAA-GTTACGTTC--GCTGATGGTAAGCTA
Klon 3	ATTCTATCACGAGTC--GTATCGTAG-GTCGAGTCT--GCTGATGGTAAGCTA
Klon 4	ATTCTATCACGAGTC--TACCTTTAC-GTGAATGAC--GCTGATGGTAAGCTA
PNA	-----N-Term-----CCGATTAAC-GCTTGCACC-----C-Term-----

Tabelle 4.2 Sequenzen der ausgewählten Klone aus Abbildung 4.59. Die Primerregionen sind grau dargestellt. Alle Klone weisen die korrekte Länge auf. Weder eine Übereinstimmung der Sequenzen mit der PNA-komplementären Sequenz noch Homologien konnten festgestellt werden. In der letzten Zeile der Tabelle ist die Sequenz der PNA dargestellt.

Ligation tetramerer, pentamerer und hexamerer Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage

Um die Ligation kleinerer Oligonukleotide mit T4 RNA Ligase zu evaluieren, wurde ssDNA mit einer Länge von 4, 5 oder 6 Nucleotiden an einer PNA-Vorlage hybridisiert und enzymatisch ligiert. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 4.60 dargestellt.

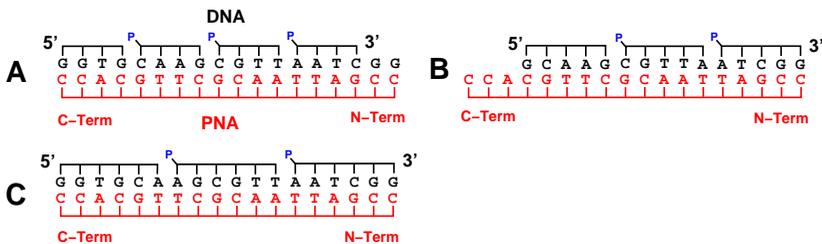


Abbildung 4.60 Ligation von 4mer, 5mer und 6mer Oligonukleotiden (schwarz) an einer PNA-Vorlage (rot). Die Oligonukleotide waren an den zu ligierenden Termini jeweils am 5'-Ende phosphoryliert (P: Phosphatgruppe). Die Testansätze enthielten vier tetramere bzw. drei pentamere oder hexamere Fragmente, deren Sequenz komplementär zu entsprechenden Bereichen der PNA waren.

Die Oligonukleotide 4merA bis 4merD, 5merA bis 5merC oder 6merA bis 6merC wurden in Konzentrationen von je $2\mu\text{M}$ zusammen mit einer äquimolaren Menge PNA, die als Ligationsvorlage diente erwärmt und langsam abgekühlt bevor BSA und T4 RNA Ligase zugegeben wurde, um die Ligation zu starten. Nach der Inkubation wurden die Ligationsprodukte mittels Gel-filtration aufgereinigt. Die Analyse erfolgte in einer denaturierenden PAGE bei 50°C , die zusätzlich 10% (v/v) Formamid enthielt, um die Denaturierung der PNA/DNA-Hybride sicherzustellen. Um das Detektionslimit zu senken, wurden die Ligationsprodukte mittels einer Silberfärbung detektiert. In Abbildung 4.61 ist die PAGE-Analyse der Ligationsprodukte dargestellt. Neben Ansätzen, mit beiden Oligonukleotiden und Ligase, wurden Kontrollen ange-setzt, die entweder keine Ligase oder keine PNA-Vorlage enthielten. Bei der Ligation von 5mer und 6mer Oligonukleotiden entstanden sowohl Produkte der vollen Länge, als auch Abbruchprodukte mit einer Länge von 10 bzw. 12 Nukleotiden. Die Ligation erfolgte anhand der PNA-Vorlage, da in Kontrol-lansätze ohne PNA keine Ligationsprodukte detektiert werden konnten. Die Ausbeute bei der Ligation der 4mer Oligonukleotide war für eine Detekti-on im Gel nicht ausreichend. Durch Referenz-Oligomere wurde sichergestellt, dass es sich um einzelsträngige DNA handelte, die aus der Ligation hervorge-gangen war und nicht um PNA/DNA-Hybride, die nicht denaturiert werden konnten.

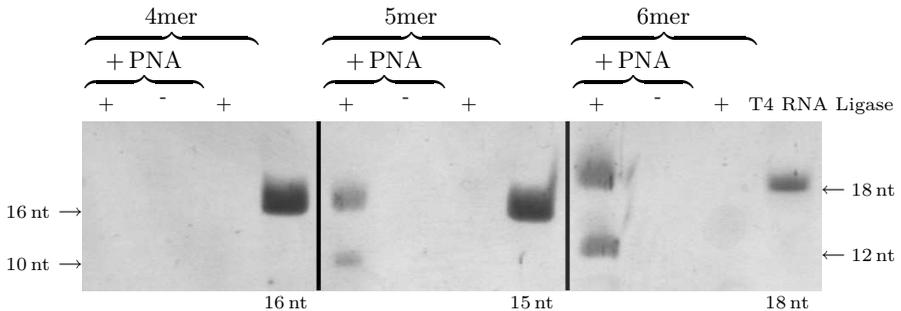


Abbildung 4.61 Analyse der Ligationsprodukte an einer PNA-Vorlage mit T4 RNA Ligase und drei oder vier Oligonukleotiden, die eine Länge von jeweils 4, 5 oder 6 Monomeren hatten, wie in Abbildung 4.60 dargestellt ist. Die Durch-führung des Experimentes kann der Seite 198 entnommen werden. Die Analyse erfolgte in einer denaturierenden PAGE mit einem 20%-igen Polyacrylamidgel. Die DNA wurde mit Hilfe einer Silberfärbung detektiert. **Große Klammern:** Ansätze mit Oligonukleotiden gleicher Länge; **kleine Klammern:** Ansätze mit PNA; **Geloberkante (+/-):**An- oder Abwesenheit von T4 RNA Ligase; **Gel-unterkante:** Länge der Referenzoligonukleotide.

Ligation tetramerer ssDNA an einer PNA-Vorlage und anschließende Amplifikation

Die Produkte der Ligation von vier DNA-Tetrameren an einer PNA-Vorlage konnten in einer PAGE nicht detektiert werden. Um zu eruieren, ob lediglich die Ausbeute für die Detektion nicht ausreichend war, oder ob tetramer DNA generell nicht an einer PNA-Vorlage ligiert werden konnte, sollte ein 4mer Oligonukleotid in eine Lücke zwischen zwei 15mer Oligonukleotide ligiert werden, die jeweils mit sieben Nukleotiden auf der PNA hybridisierten und einen Bereich von vier Basen auf der PNA-Vorlage frei ließen. Die bekannten Sequenzen der flankierenden ssDNA wurden anschließend für die Amplifikation der Ligationsprodukte verwendet, wie in Abbildung 4.62 dargestellt.

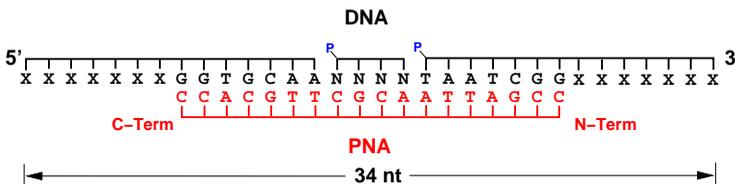


Abbildung 4.62 Darstellung der Ligation einer tetrameren DNA in eine Lücke zwischen zwei Oligonukleotide an einer PNA-Vorlage (rot). Jeweils die 5'-Enden der zu ligierenden Oligonukleotide wurden phosphoryliert (P: Phosphatgruppe). Über die bekannten flankierenden Sequenzen konnten die entstandenen Ligationsprodukte nach der Ligation durch eine PCR amplifiziert werden. Es wurden im Verlauf der Untersuchungen sowohl definierte tetramer Oligonukleotide eingesetzt, deren Sequenz der zur PNA komplementären Sequenz entsprach, als auch randomisierte Oligonukleotide, um die Sequenz in der Lücke zu ermitteln.

Die PCR-Produkte hatten die erwartete Länge von 34 bp. Im weiteren Verlauf wurden statt definierter tetramerer Oligonukleotide, die eine zur PNA komplementäre Sequenz besaßen, eine Bibliothek aus randomisierten tetramer Oligonukleotiden in der Ligation eingesetzt. So sollte getestet werden, ob die Ligation der DNA sequenzspezifisch an der PNA-Vorlage ablief und ob sich mittels dieser Methode die PNA-Sequenz ermitteln ließ. Nach Ligation und Amplifikation wurde die erhaltene DNA mit einer Länge von 34 bp (Abbildung 4.64, links) in ein Plasmid subkloniert und monoklonalisiert. Die Klone wurden vor der Sequenzierung durch eine Multiplex-PCR untersucht (Abbildung 4.63), um Hinweise auf die Sequenz der vier ligierten Nukleotide zu erhalten. Neun von zehn PCR-Ansätzen, deren Analyse rechts in Abbildung 4.64 dargestellt ist, enthielten zwei Amplifikate mit den erwarteten Längen. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA von sechs Klonen ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

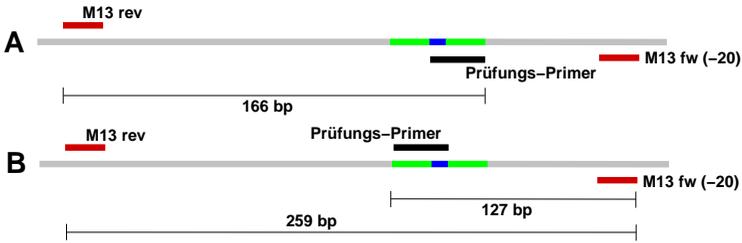


Abbildung 4.63 Darstellung der Multiplex-PCR zur Überprüfung der Klone. Die PCR wurde mit drei Primern durchgeführt. Die Primer M13rev und M13fw(-20) (rot) hybridisierten vor bzw. hinter der Klonierungsstelle des Plasmids. Der dritte Primer (schwarz) hybridisierte an dem subklonierten Amplifikat des Ligationsproduktes, wobei dessen 3'-Ende in der Sequenz lag, die vom ligierten DNA-Tetramer eingebracht wurde. Entsprechend der Sequenz der 4 bp im Plasmid (blau) der erwarteten, so entstanden zwei Amplifikate mit unterschiedlicher Länge von 259 bp und 166 bp bzw. 127 bp, was von der Orientierung der subklonierten DNA abhing. Die PCR stellte daher Informationen über die Anwesenheit und die Länge der eingefügten DNA, sowie deren Orientierung im Plasmid zur Verfügung.

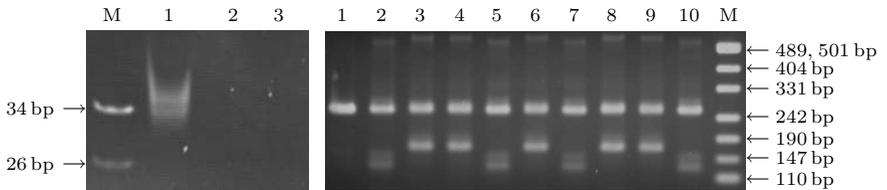


Abbildung 4.64 Links: Analyse der PCR nach Amplifikation der Produkte einer Ligation randomisierter tetramerer DNA in eine Lücke zwischen zwei Oligonukleotide an einer PNA. Die Durchführung des Versuches ist auf Seite 198 beschrieben. Die Trennung erfolgte in einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **Bahn 1:** Ansatz mit PNA, mit Ligase; **Bahn 2:** Ansatz ohne PNA, mit Ligase; **Bahn 3:** Ansatz mit PNA, ohne Ligase. **Rechts:** Kontrolle der Klone mittels einer Multiplex-PCR mit den Primern M13, M13fw(-20) und 4merLig5'-check nach Subklonierung der PCR-Produkte in das Plasmid pZero2. Alle Klone außer Klon 1 wiesen zwei Amplifikate mit den erwarteten Längen von 259 bp und 166 bp bzw. 259 bp und 127 bp auf. Die Längenunterschiede der kürzeren PCR-Produkte resultierten aus der entgegengesetzten Orientierung der eingefügten DNA im Plasmid. Die Amplifikate wurden in einem 3%-igen Agarosegel analysiert. **Bahn 1-10:** PCR auf der Plasmid-DNA. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI).

Klon	Sequenz
Klon 3	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
Klon 4	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
Klon 5	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
Klon 6	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
Klon 7	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
Klon 10	CATTAGTT- GGTGCAAGCGT TAATCGG-GATCTGAG
PNA	C-Term CCACGTT CGCA ATTAGCC N-Term

Tabelle 4.3 Sequenzen der Klone aus Abbildung 4.64. Die grün eingefärbten Abschnitte hybridisierten auf der PNA, deren Sequenz in der letzten Zeile angegeben ist. Die rot eingefärbten Abschnitte sind entsprechend der PNA-Vorlage bei der Ligation von degenerierten Tetrameren eingefügt worden.

Ligation dimerer ssDNA an einer PNA-Vorlage und anschließende Amplifikation

T4 RNA Ligase katalysiert die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einem 5'-phosphorylierten Donor Substrat und einem Akzeptor-Oligonukleotid, das eine 3'-Hydroxygruppe zur Verfügung stellt. Die Mindestgröße des Akzeptor Substrates beträgt drei Nukleotide. Bei der Verwendung von DNA-Fragmenten, die eine Länge von drei oder mehr Nukleotiden haben war daher eine Ligation der Fragmente durch T4 RNA Ligase untereinander möglich. Dieser Vorgang stellte eine Konkurrenzreaktion zu der eigentlich gewünschten Ligation der DNA an der PNA-Vorlage dar, die durch Verwendung von Dimeren umgangen werden könnte. Weiterhin beträgt die Anzahl der möglichen Sequenzkombinationen bei Dimeren lediglich 16 im Gegensatz zu Tetrameren, bei denen 256 verschiedene Spezies möglich sind. Damit ist die Konzentration jedes individuellen Fragmentes bei Verwendung von Dimeren und bei gleichen Stoffmengen der eingesetzten Bibliothek um Faktor 16 höher als bei Tetrameren.

Um zu evaluieren, ob DNA-Dimere in der Ligationsreaktion eingesetzt werden können, wurden analog zu vorhergehenden Experimenten die Oligonukleotide 4merLig5' und 4merLig3' verwendet, die mit jeweils sieben Nukleotiden an der PNA hybridisierten, so dass zwischen ihnen ein Raum für vier Nukleotide frei blieb. Diese wurden in einer Konzentration von 80 nM eingesetzt. Die Konzentration der PNA betrug 100 nM, so dass diese in einem leichten molaren Überschuss zu den Oligonukleotiden vorlag. In den Reaktionsansätzen befanden sich weiterhin randomisierte DNA-Dimere, die am 5'-Ende phosphoryliert waren. Nach kurzem Erwärmen und Abkühlen der Ansätze wurde mit T4 RNA

Ligase inkubiert. Die entstandenen PNA/DNA-Hybride wurden mittels der Biotingruppe der PNA in Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäßen immobilisiert und nicht gebundene Komponenten durch Waschen entfernt. Die Amplifikation der DNA in den immobilisierten PNA/DNA-Hybriden erfolgte durch Zugabe einer PCR-Reaktionsmischung in die Reaktionsgefäße, die dann entsprechenden Temperaturzyklen ausgesetzt wurden. Die Amplifikationsreaktionen wurden mittels einer PAGE analysiert, wiesen jedoch keine Amplifikate der erwarteten Länge auf.

Die für eine Amplifikation zu geringe Menge der Ligationsprodukte bei Benutzung von dimeren ssDNA-Fragmenten wurde zum einen auf Verluste durch eine unvollständige Immobilisierung, zum anderen auf eine unzureichende Effizienz der Ligation zurückgeführt. Der Grund hierfür konnte unter anderem in der Abwesenheit von DTT im Reaktionspuffer der Ligation liegen, da die Verbindung zwischen der PNA und der Biotingruppe mit einer Disulfidgruppe versehen war und diese dadurch reaktiv gespalten werden würde. Der optimale Puffer für die Funktion der T4 RNA Ligase enthielt jedoch DTT in Konzentrationen bis zu 20 mM.

Um die Bedingungen der Ligation zu optimieren wurde den Reaktionsansätzen bei folgenden Experimenten DTT zugesetzt. Dadurch war eine Immobilisierung über die Biotingruppe nicht mehr möglich, weshalb Anteile der Ligationsansätze direkt in die Amplifikationsreaktionen gegeben wurden. Nach der Inkubation wurde 1 µl der Ligationsansätze in die PCR mit einem Volumen von 50 µl und den Primern 4merLig5' und 4merLig3'rev gegeben. Die PAGE-Analyse der PCR-Produkte ist in Abbildung 4.65 dargestellt.

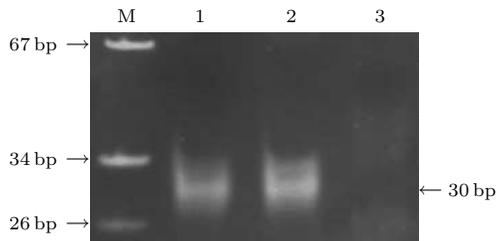


Abbildung 4.65 Analyse der Amplifikationsansätze nach Ligation von ssDNA-Dimeren in eine 4er Lücke zwischen zwei auf einer PNA hybridisierten Oligonukleotide. Das Experiment ist schematisch in Abbildung 4.62 dargestellt. Die Durchführung ist auf Seite 198 beschrieben. Die Analyse erfolgte in einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. Amplifikate mit der erwarteten Länge von 34 bp wurden nicht erhalten. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1:** Ansatz mit PNA; **Bahn 2:** Ansatz ohne PNA; **Bahn 3:** Negativkontrolle für PCR.

Wie in Abbildung 4.62 ersichtlich, betrug die erwartete Länge der Amplifikate bei einer Ligation von zwei Dimeren zwischen die Oligonukleotide 34 bp. Die

erhaltenen Amplifikate wiesen jedoch eine Länge von 30 bp auf, was auf die Amplifikation von DNA zurückzuführen war, die durch direkte Ligation der zugegebenen Oligonukleotide 4merLig5' und 4merLig3' entstanden war, denn diese hatten Längen von jeweils 15 nt. Die Dimere wurden daher entweder nicht zwischen die Oligonukleotide ligiert, oder die direkt aneinander ligierten Oligonukleotide lagen in einer höheren Konzentration vor, als die gewünschten Produkte, so dass diese in der PCR präferenziell amplifiziert wurden.

Ligation randomisierter tetramerer ssDNA in eine 8er Lücke

Da der Grund für die geringe Ligationseffizienz der DNA-Dimere in einer zu schwachen Wechselwirkung mit der PNA liegen konnte, sollte im weiteren Verlauf die Ligation von zwei ssDNA-Tetrameren in eine Lücke getestet werden. Dazu wurden die Oligonukleotide 2x4merLig5' und 2x4merLig3' verwendet, die im Gegensatz zu den vorher verwendeten flankierenden Oligonukleotiden um jeweils zwei Nukleotide gekürzt wurden, so dass zwischen ihnen nach der Hybridisierung an der PNA eine Lücke von acht Nukleotiden vorhanden war, wie in Abbildung 4.66 dargestellt ist.

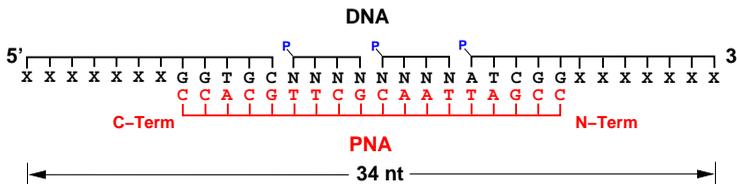


Abbildung 4.66 Darstellung der Ligation tetramerer DNA-Fragmente in eine Lücke aus acht Nukleotiden zwischen zwei Oligomeren, die an einer PNA-Vorlage (rot) hybridisierten. Jeweils die 5'-Enden der zu ligierenden Oligonukleotide wurden phosphoryliert (P: Phosphatgruppe). Über die bekannten flankierenden Sequenzen konnten die entstandenen Ligationenprodukte nach der Ligation durch eine PCR amplifiziert werden. Es wurden im Verlauf der Untersuchungen sowohl definierte tetramere Oligonukleotide eingesetzt, deren Sequenz der zur PNA komplementären Sequenz entsprach, als auch randomisierte Oligonukleotide, um die Sequenz in der Lücke zu ermitteln.

Die Ligationenreaktionen wurden analog zu vorhergehenden Experimenten angesetzt und enthielten die flankierenden Oligonukleotide in Konzentrationen von je 80 nM, PNA in einer Konzentration von 100 nM und 4 μ M randomisierte tetramere ssDNA.

Die Amplifikation der Ligationenprodukte erfolgte sowohl nach einer Immobilisierung der PNA/DNA-Hybride in einem Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäß, als auch durch direkte Zugabe von 1 μ l der Ligationenreaktion in

einer PCR, wobei der Ligationspuffer bei dieser Vorgehensweise 20 mM DTT enthielt. Die Analyse der Amplifikationsreaktionen nach der Immobilisierung der PNA/DNA-Hybride in einer PAGE zeigte jedoch bei keinem der Experimente Amplifikate der erwarteten Länge.

Die Analyse der Amplifikate nach direkter Zugabe der Ligationsreaktionen in die PCR ist in Abbildung 4.67 dargestellt. Die Länge der erhaltenen Amplifikate betrug 26 bp, was der Länge der direkt aneinander ligierten Oligonukleotide 2x4merLig5' und 2x4merLig3' entspricht, die jeweils 13 nt lang waren. Amplifikate mit einer Länge von 34 bp, die nach der Ligation von zwei DNA-Tetrameren in die Lücke zu erwarten gewesen wäre, waren nur in Spuren vorhanden. Dies wurde auf die Menge der direkt aneinander ligierten Oligonukleotide nach der Ligation zurückgeführt, die offenbar höher war, als die Menge derer, zwischen die tetramere ssDNA ligiert wurde, so dass diese bei der Amplifikation überwiegend vervielfältigt wurden. Auch die Veränderung der ATP-Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Verhältnis der verschiedenen Ligationsprodukte.

Die Amplifikate mit einer Länge von 34 bp in Abbildung 4.67 auf Bahn 1 wurden aus dem Polyacrylamidgel eluiert und in einer sekundären PCR amplifiziert. Die dadurch erhaltenen Amplifikate mit einer Länge von 34 bp, wurden in einen geeignetes Plasmid subkloniert, monoklonalisiert und mittels einer PCR (Abbildung 4.63) auf die Anwesenheit der erwarteten PNA komplementären Sequenz im Bereich der Lücke untersucht. Es konnte allerdings keine Plasmid-DNA mit der erwarteten Sequenz detektiert werden. Die entstandenen Amplifikate waren daher entweder auf eine Vorlagen-unabhängige Ligation von ssDNA in Lösung, oder auf unspezifische Amplifikation während der PCR zurückzuführen.

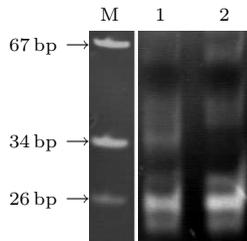


Abbildung 4.67 Ligation von tetramerer ssDNA an einer PNA-Vorlage in eine 8er Lücke, wie in Abbildung 4.66 dargestellt. Die zwei Ligationsreaktionen enthielten das für die Ligation essentielle ATP in verschiedenen Konzentrationen. Die Durchführung ist auf Seite 199 beschrieben. Die Analyse erfolgte in einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1:** Ansatz mit 100 μ M ATP; **Bahn 2:** Ansatz mit 20 μ M ATP

Ligation definierter tetramerer ssDNA in eine 8er Lücke

Die Ligationen im vorangegangenen Experiment wurden unter Zugabe vollständig randomisierter ssDNA durchgeführt. Um zu evaluieren, ob die Ligation durch einen Mangel an komplementären Fragmenten verhindert wurde, sollten im folgenden Experiment zwei tetramere Oligonukleotide mit einer definierten, zur PNA komplementären Sequenz in Konzentrationen von je $2\ \mu\text{M}$ statt randomisierter DNA eingesetzt werden. Die Durchführung der Ligation und der Amplifikation verlief analog zum oben beschriebenen Experiment. Nach variierenden Inkubationszeiten wurden jedoch auch hier stets Amplifikate der direkt aneinander ligierten flankierenden Oligonukleotide erhalten (Daten nicht gezeigt).

Dies wurde auf die direkte Ligation flankierender Oligonukleotide zurückgeführt, die in Konkurrenz zur gewünschten Füllung der Lücke ablief und somit eine PCR-Vorlage lieferte. Da hierbei lediglich ein Ligationsschritt nötig war, war diese Vorlage in einer größeren Menge vorhanden, als das gewünschte Produkt, für dessen Herstellung drei Ligationen nötig waren und dessen Amplifikation somit unterdrückt wurde.

Verwendung eines ATP-Regenerationssystems

Die Konzentration des ATP in den Ligationensätzen stellt einen kritischen Parameter dar, da auf Zugabe von ATP als essentieller Kofaktor für die T4 RNA Ligase nicht verzichtet werden konnte. Andererseits führt eine zu hohe ATP-Konzentration zu einer Inhibition der T4 RNA Ligase, der in den Abläufen des Ligationprozesses begründet lag [175]. Insbesondere bei Inkubationszeiten von mehreren Tagen musste jedoch die Anwesenheit von ATP in möglichst konstanten Konzentrationen gewährleistet sein.

Um die Ausbeute der Ligationenreaktionen mit T4 RNA Ligase zu optimieren, wurde daher ein System zur Regeneration von ATP in die Ligationenreaktionen implementiert. Dieses bestand aus 170 U/ml Myokinase, 170 U/ml Kreatinkinase und 30 mM Phosphokreatin in den Reaktionsansätzen. Das bei der Ligation anfallende AMP wurde so durch die Kreatinkinase phosphoryliert. Myokinase setzte anschließend ADP in AMP und ATP um, dass dann der Ligation zur Verfügung stand.

In verschiedenen Ligationsexperimenten mit ATP-Regenerationssystem, bei denen sowohl tetramere als auch dimere ssDNA in Lücken zwischen zwei an einer PNA hybridisierten Oligonukleotide ligiert werden sollten, wurden nach der PCR größere DNA-Mengen erhalten, als bei Ansätzen ohne ATP-Regeneration (Daten nicht gezeigt). Dies wurde auf eine höhere Effizienz der Ligation zurückgeführt, durch die eine größere Menge der PCR-Vorlage vorhanden war. Die Amplifikate wiesen allerdings nicht die erwartete Länge auf.

Offenbar erhöhte die Verwendung eines ATP-Regenerationssystems daher lediglich die Ausbeute der Ligation mit T4 RNA Ligase. Das Verhältnis der entstandenen Produkte wurde jedoch nicht beeinflusst.

Verlängerung eines Startoligonukleotides an einer PNA-Vorlage

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die direkte Ligation der flankierenden Oligonukleotide eine störende Konkurrenzreaktion zum Einbau der ssDNA-Fragmente darstellte. Um die Anwesenheit der dadurch erhaltenen PCR-Vorlage, die die Amplifikation der gewünschten Ligationsprodukte verhinderte, zu unterbinden, sollte im Folgenden lediglich ein Oligonukleotid, das mit sechs Nukleotiden auf einer PNA-Vorlage hybridisiert durch die Ligation von ssDNA-Fragmenten sequenzspezifisch an der PNA verlängert werden.

Amplifikation mittels Ligation terminaler Oligonukleotide

Zum Zwecke der Amplifikation komplementärer DNA wurde nach der Synthese ein terminales Oligonukleotid an diese ligiert, um eine Primerbindungsstelle zu generieren. Um die Ligation von ssDNA-Fragmenten untereinander zu umgehen und damit längere Inkubationszeiten zu ermöglichen sollte die komplementäre DNA zunächst aus 5'-phosphorylierten ssDNA-Dimeren aufgebaut werden, wie schematisch in Abbildung 4.68 dargestellt.

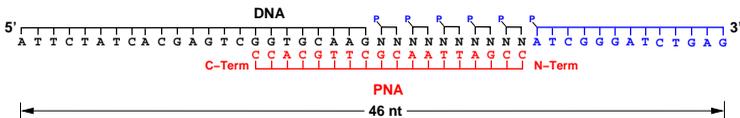


Abbildung 4.68 Darstellung der Verlängerung eines Startoligonukleotides durch Ligation von ssDNA-Dimeren. Das Oligonukleotid (schwarz) hybridisiert mit sechs Nucleotiden an der PNA (rot). Am freien Bereich von 12 Nucleotiden der PNA wird durch 5'-phosphorylierte ssDNA-Fragmente eine PNA-komplementäre DNA aufgebaut. Nach der Ligation der komplementären Fragmente, wird ein terminales Oligonukleotid (blau), welches ebenfalls am 5'-Ende phosphoryliert ist, an die erhaltene DNA ligiert, um eine Primerbindungsstelle für die Amplifikation des Ligationsproduktes zu generieren.

Die Ligrationsreaktionen wurden unter analogen Pufferbedingungen, wie in vorangegangenen Experimenten durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten die Oligonukleotide APos2(5)(-1)D2-1rev, PNA und ssDNA-Dimere, aus denen mittels T4 RNA Ligase die komplementäre DNA synthetisiert werden sollte. Nach variierenden Inkubationszeiten von 5 h bis 3 Tagen wurden die

Ergebnisse

terminalen Oligonukleotide zu den Reaktionsmischungen gegeben und diese weitere 15 h inkubiert. Die Amplifikation der Ligationsprodukte erfolgte durch die direkte Zugabe des Ligationsansatzes in einen PCR-Ansatz. Die PAGE-Analyse der Amplifikate ist in Abbildung 4.69 gezeigt. Bei einer Verlängerung des Startoligonukleotides über die gesamte Länge der PNA und anschließender Ligation des terminalen Oligonukleotides waren Amplifikate mit einer Länge von 46 bp zu erwarten.

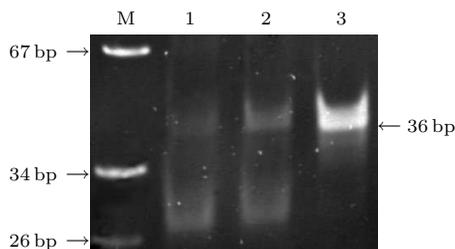


Abbildung 4.69 Analyse der Amplifikationsreaktionen nach Verlängerung eines Startoligonukleotides mit ssDNA-Dimeren und anschließender Ligation eines terminalen Oligonukleotides durch T4 RNA Ligase, wie in Abbildung 4.68 schematisch dargestellt. Die Durchführung des Experimentes ist auf Seite 199 beschrieben. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 15%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); Konzentrationen der Oligonukleotide APos2(5)(-1)D2-1rev und 2x4merLig3': **Bahn 1:** 20 nM je Oligomer; **Bahn 2:** 40 nM je Oligomer; **Bahn 3:** 60 nM je Oligomer.

Bei der Analyse der PCR konnten jedoch keine Amplifikate mit der erwarteten Länge detektiert werden. Die erhaltene DNA hatte eine Länge von 36 bp, was einer direkten Ligation der Oligonukleotide APos2(5)(-1)D2-1rev und 2x4merLig3' entsprach. Auch durch einen molaren Überschuss der PNA-Vorlage um einen Faktor >16 gegenüber den zugegebenen Oligonukleotiden konnte die direkte Ligation nicht unterbunden werden.

Amplifikation mittels komplementärer Primer

Da sich die Ligation eines terminalen Oligonukleotides für die Generierung einer Primerbindungsstelle als problematisch erwies, sollte die Amplifikation bei den folgenden Experimenten mit Primern durchgeführt werden, die komplementär zu der erwarteten Sequenz, der erzeugten DNA waren. Es wurden damit also Sequenzabschnitte der aufgebauten DNA, die komplementär zu der PNA-Vorlage waren als Hybridisierungsstellen für die Primer verwendet. In Abbildung 4.70 ist der Ablauf der Ligation und der Amplifikation schematisch dargestellt.

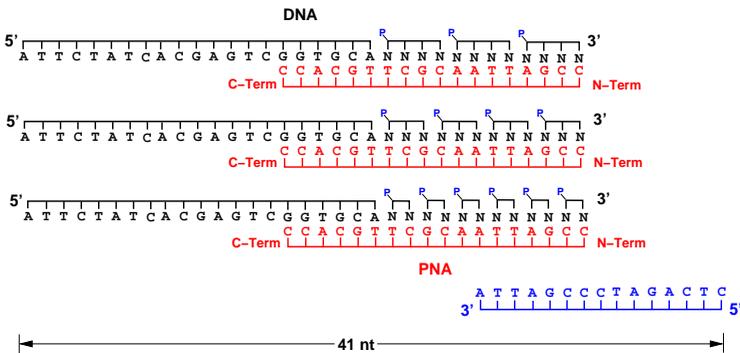


Abbildung 4.70 Darstellung der sequenzspezifischen Verlängerung eines Oligonukleotids an einer PNA-Vorlage (rot). Die komplementäre DNA wurde aus tetramerer, trimerer oder dimerer ssDNA durch Ligation mit T4 RNA Ligase aufgebaut. Die Amplifikation der Ligationsprodukte erfolgte bei dieser Methode mit dem eingesetzten Startoligonukleotid und einem weiteren Oligonukleotid (blau), dass mit sieben Nucleotiden an der aufgebauten DNA hybridisierte. Amplifikate konnten bei dieser Vorgehensweise daher nur erhalten werden, wenn durch die Ligation die richtige Sequenz über einen Abschnitt von 12 Nucleotiden an der PNA entstanden war.

Bei der experimentellen Durchführung wurden die Oligonukleotide APos2(5)-(3)D2-1rev, randomisierte ssDNA-Fragmente mit einer Länge von zwei, drei oder vier Nucleotiden, sowie 18mer PNA verwendet. Die Ligrationsreaktion wurde analog zu dem vorhergehenden Experiment durchgeführt, jedoch wurde auf die Ligation eines terminalen Oligonukleotids verzichtet und die Ligrationsprodukte unmittelbar nach dem Aufbau der komplementären DNA wie in Abbildung 4.70 gezeigt amplifiziert. Die Analyse der Amplifikate ist in Abbildung 4.71 dargestellt. Aus dieser ist ersichtlich, dass Amplifikate mit einer Länge von 41 bp lediglich für die Reaktionen erhalten wurden, in denen eine PNA-Vorlage vorhanden war. Weiterhin wiesen die Reaktionen, bei denen tetramere ssDNA für den Aufbau der komplementären DNA verwendet wurde, bereits nach 6 h Inkubation ausreichende Mengen des Ligrationsproduktes mit der richtigen Sequenz auf. Bei der Verwendung von trimerer ssDNA wurde erst nach 5 Tagen Inkubation ausreichend Ligrationsprodukt für eine Amplifikation erhalten. Ansätze, die dimere ssDNA als Bausteine enthielten, zeigten auch nach 14 Tagen Inkubation keine Amplifikate mit der erwarteten Länge nach der Amplifikation.

Die nach der Amplifikation der Ligrationsprodukte erhaltene DNA, sowohl für die Reaktion von Trimeren als auch für die Reaktion von Tetrameren, wurde in ein Plasmid kloniert, monoklonalisiert und mittels einer PCR auf die richtige Sequenz überprüft (Abbildung 4.72). Die erhaltene Plasmid-DNA von vier positiven Klonen wurde sequenziert und mit der erwarteten Sequenz

Ergebnisse

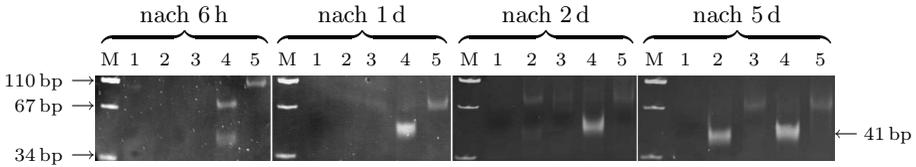


Abbildung 4.71 Analyse der Amplifikationsreaktionen nach Verlängerung eines Startoligonukleotides mit trimerer und tetramerer ssDNA. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung von Primern, die an der durch die Ligation aufgebauten DNA hybridisierten, wie in Abbildung 4.70 schematisch dargestellt. Die Durchführung des Experimentes ist auf Seite 199 beschrieben. Für alle Gele: **M**: DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1**: Negativkontrolle für PCR; **Bahn 2**: trimere ssDNA mit PNA; **Bahn 3**: trimere ssDNA ohne PNA; **Bahn 4**: tetramere ssDNA mit PNA; **Bahn 5**: tetramere ssDNA ohne PNA. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen.

abgeglichen. Obwohl die Amplifikation der Ligationsprodukte einen korrekten sequenzspezifischen Aufbau von 12 Nukleotiden voraussetzte, konnten nach der Sequenzierung lediglich fünf Nukleotide verifiziert werden. Die Sequenzen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Klone, die nach der Kontrolle durch eine Multiplex-PCR, wie auf Seite 121 in Abbildung 4.63 dargestellt, zwei Amplifikate aufwiesen, beinhalteten auch den erwarteten PNA-komplementären Sequenzabschnitt.

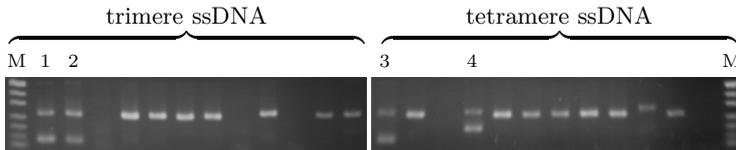


Abbildung 4.72 Kontrolle der Plasmid-DNA durch eine Multiplex-PCR, wie in Abbildung 4.63 auf Seite 121 schematisch dargestellt. Die Amplifikate der Ligationsprodukte wurden in das Plasmid pZero2 kloniert. Die PCR enthielt die Primer M13fw(-20), M13rev und APos2(5)D2-1rev. Es wurde sowohl DNA aus der Ligation mit trimerer als auch mit tetramerer ssDNA untersucht (siehe Klammern). Die Klone, bei denen zwei Amplifikate detektiert wurden (numerierte Klone), beinhalteten die richtige Sequenz und wurden sequenziert. Die Längenunterschiede der kürzeren PCR-Produkte resultierten aus der entgegengesetzten Orientierung der eingefügten DNA im Plasmid. Die Trennung der DNA erfolgte in 3 % Agarose.

Amplifikation mittels zweier komplementärer Primer

Im weiteren Verlauf sollte gezeigt werden, ob eine PNA-komplementäre DNA lediglich aus ssDNA-Trimeren ohne Verwendung eines Startoligonukleotides

Klon	Sequenz
Klon 1	ATTCTATCACGAGTCGGT GC A- AGCGT - TAATCGG GATCTGAG
Klon 2	ATTCTATCACGAGTCGGT GC A- AGCGT - TAATCGG GATCTGAG
Klon 3	ATTCTATCACGAGTCGGT GC A- AGCGT - TAATCGG GATCTGAG
Klon 4	ATTCTATCACGAGTCGGT GC A- AGCGT - TAATCGG GATCTGAG
PNA	-----C-Term-CCACGT- TCGCA -ATTAGCC-N-Term

Tabelle 4.4 Sequenzen der Klone aus Abbildung 4.72. Die grün eingefärbten Abschnitte hybridisierten auf der PNA, deren Sequenz in der letzten Zeile angegeben ist. Die rot und blau eingefärbten Abschnitte sind entsprechend der PNA-Vorlage bei der Ligation von degenerierten Fragmenten generiert worden, wobei die blauen Abschnitte als Hybridisierungsstelle für den Primer dienen.

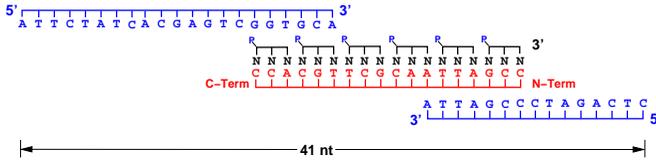


Abbildung 4.73 Darstellung der enzymatischen Synthese einer komplementären DNA aus trimerer ssDNA (schwarz) an einer PNA-Vorlage (rot). Die Amplifikation der DNA wird mit zwei Primern (blau) durchgeführt, die partiell an der generierten DNA hybridisieren und durch Überhänge die Primerregionen verlängern.

unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen hergestellt werden konnte. Da die generierte DNA hierbei keine Überhänge aufwies, musste die Amplifikation mit zwei komplementären Oligonukleotiden durchgeführt werden. Die Pufferzusammensetzung der Reaktionen für die Ligation entsprach der im oben beschriebenen Experiment für die Verlängerung eines Startoligonukleotides mit ssDNA-Fragmenten. Die Ansätze enthielten jedoch in diesem Fall lediglich die PNA-Vorlage und 5'-phosphorylierte ssDNA-Trimere. Nach 5 Tagen Inkubation bei RT wurde 1 µl der Ligrationsreaktionen in PCR-Ansätze gegeben, die die Primer APos2(5)(-3)D2-1rev und 4merLig3'rev enthielten. Es wurden jedoch keine Amplifikate erhalten (Daten nicht gezeigt). Dies konnte entweder auf eine unzureichende Menge des Ligrationsproduktes oder auf zu geringe Schmelztemperaturen der überlappenden Bereiche bei den Primern zurückgeführt werden, die lediglich sechs bzw. sieben Nukleotide umfassten.

Ligation zweier terminaler Oligonukleotide und Abbau direkt ligierter Produkte

Die Amplifikation der Ligationsprodukte verlief mit Primern, die mit Bereichen der PNA-komplementären DNA überlappten, aufgrund der Kürze der überlappenden Bereichen nicht optimal. Weiterhin waren hierfür ebenfalls mindestens sechs definierte Nucleobasen an den terminalen Bereichen der PNA notwendig. Dies konnte durch die Ligation von terminalen Oligonukleotiden an die generierte DNA umgangen werden, die Primerregionen für eine nachgeschaltete Amplifikation zur Verfügung stellten.

Vorangegangene Experimente zeigten jedoch, dass die direkte Ligation terminaler Oligonukleotide aneinander problematisch war, da dadurch eine PCR-Vorlage für die Amplifikation der Ligationsprodukte in störenden Mengen hergestellt wurde. Um eine Amplifikation dieser direkt aneinander ligierten Oligonukleotide zu verhindern, sollten diese vor der PCR durch eine Restriktionsendonuklease spezifisch degradiert werden. Das Prinzip dieser Degradierung ist in Abbildung 4.74 dargestellt.

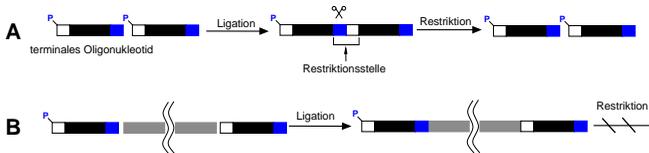


Abbildung 4.74 Darstellung der spezifischen Degradierung direkt aneinander ligierter terminaler Oligonukleotide. Zur Generierung von Primerbindungsstellen dient ein 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid. Dieses ist terminal mit Sequenzen versehen (weiß und blau), die bei einer direkten Ligation zweier Oligonukleotiden aneinander eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease erzeugen (weiß/blau). So entstandene Ligationsprodukte werden von einer entsprechenden Nuklease hydrolysiert (**A**). Befindet sich andere DNA zwischen zwei terminalen Oligonukleotiden, so ist keine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease vorhanden (**B**).

Die Synthese einer komplementären DNA an der PNA erfolgte lediglich aus trimerer ssDNA ohne die Verwendung eines Startoligonukleotides mit Überhang. Es wurde jedoch ein Trinukleotid in einer Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ und damit im Überschuss zur PNA zugegeben, dass zu den ersten drei Basen am C-Terminus der PNA komplementär war, um eine Verlängerung über die gesamte Länge der PNA zu forcieren. Ansonsten entsprach die DNA-Synthese bezüglich der Durchführung und der Zusammensetzung der Reaktion dem in Abbildung 4.71 gezeigten und beschriebenen Experiment. Nach einer Inkubation von 5 Tagen für die komplette DNA-Synthese, wurde ein 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid bis zu einer Endkonzentration von $1\ \mu\text{M}$

zum Ligationsansatz gegeben, welches potenziell an beide Enden der entstandenen DNA ligiert werden konnte, wie in Abbildung 4.74 dargestellt. Nach 15 h weiterer Inkubation wurde 1 µl des Ligationsansatzes in einen PCR-Reaktionsansatz gegeben, der ein entsprechendes Restriktionsenzym (HindIII) enthielt. Die PCR wurde 15 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Temperaturzyklen für die Amplifikation gestartet wurden, wobei das Restriktionsenzym thermisch inaktiviert wurde. Die Amplifikate wurden in einer PAGE analysiert, die in Abbildung 4.75 gezeigt ist. Diese zeigt mehrere Amplifikate, die unabhängig von der An- oder Abwesenheit der PNA entstanden sind und die auf unspezifische Elongation durch die Polymerase während der vorgeschalteten Inkubation zurückgeführt wurden.

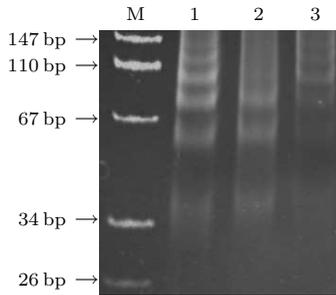


Abbildung 4.75 Analyse der Amplifikate nach DNA-Synthese an der PNA und Amplifikation mittels zweier ligierter terminaler Oligonukleotide. Direkt ligierte terminale Oligonukleotide sollten durch das Restriktionsenzym HindII wie in Abbildung 4.74 beschrieben hydrolysiert werden. Die Durchführung des Experimentes ist auf Seite 200 beschrieben. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. **M:** DNA-Standard (pUC19/MspI); **Bahn 1:** mit PNA ; **Bahn 2:** ohne PNA; **Bahn 3:** Negativkontrolle für PCR.

5 Diskussion

Allgemeines

Spezifische Liganden mit Affinität für ein bestimmtes Zielmolekül finden Verwendung in verschiedenen Anwendungsbereichen, wie beispielsweise als Wirkstoffe in pharmazeutischen Präparaten. Diese greifen generell in biologische Vorgänge ein, die aus der Interaktion verschiedener Effektor-Moleküle bestehen. Neben der Affinität ist hierbei vor allem die Spezifität der Liganden entscheidend, da diese die Gefahr ungewünschter Interaktionen und damit die Nebenwirkungen der Wirkstoffe herabsetzt. Das zweite große Einsatzgebiet spezifischer Liganden liegt in der diagnostischen Anwendung. Die Nachfrage nach leistungsfähigen biologischen Detektoren besteht beispielsweise in der biologischen, biochemischen und medizinischen Forschung, der Umweltanalytik und der klinischen Diagnostik. In biologisch basierten Detektionssystemen bilden spezifische und hoch affine Liganden neben einem entsprechenden System zur Erzeugung eines auswertbaren Signals die zentrale Komponente der Sensorik. Die Interaktion eines Liganden an ein Zielmolekül stellt dabei jedoch den zentralen Vorgang der Detektion dar und macht die Verfügbarkeit entsprechender Liganden substanziell für die Entwicklung diagnostischer Systeme dessen erfolgreicher Einsatz nicht unmaßgeblich von den Eigenschaften der Liganden, wie Spezifität und Affinität beeinflusst wird. Bei allen Anwendungen ist weiterhin die Stabilität der Liganden ein wichtiger Faktor bei der Applikation.

Die bekanntesten spezifischen und affinen Liganden sind Antikörper, die immer noch die wichtigste Gruppe biologischer Liganden für Therapie und Diagnostik darstellen [176]. Die Herstellung durch die Immunisierung von Tieren und anschließender Isolierung der Antikörper aus deren Serum ist jedoch zeitaufwendig und kostenintensiv. Weitere Nachteile bestehen in der Tatsache, dass sich toxische Zielmoleküle teilweise der Antikörperproduktion entziehen und in der Inhomogenität der Antikörper. Durch die Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen ist die Herstellung monoklonaler Antikörper zwar möglich [177], jedoch ist die Produktion in eukaryotischen Expressionssystemen nach wie vor kostenintensiv und toxische Substanzen bleiben weiterhin unzugänglich.

Kombinatorische Konzepte stellen eine Alternative zur Produktion von Liganden durch Tierimmunisierung dar. Grundlegendes Prinzip ist die parallele Synthese einer Vielzahl verschiedener Verbindungen – einer Bibliothek – und eine anschließende Selektion jener Verbindungen, die über gewünschte

Eigenschaften verfügen. Für diese Selektion existiert eine Vielzahl von Technologien, die den Beschaffenheiten der Bibliotheks-Moleküle angepasst sind [178]. Diese reichen von der parallelen und isolierten Synthese einzelner Komponenten in hunderten von Reaktionsansätzen und deren Erprobung bis zur gleichzeitigen Synthese vieler Komponenten in einem Reaktionsansatz, beispielsweise auf markierten Mikropartikeln [19] für deren Isolierung und Identifizierung.

Andere Selektionstechniken basieren auf der Verwendung evolutionärer Verfahren. Die Herstellung besteht hierbei aus wiederholter Auslese und Vervielfältigung jener Komponenten, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Damit wird ein Verfahren *in vitro* nachempfunden, durch das auch die Natur Individuen mit optimierten Fähigkeiten generiert. Ausgehend von einer Bibliothek, die aus biologisch replizierbaren Komponenten besteht, wird eine Selektion der Bibliothek hinsichtlich gewünschter Eigenschaften durchgeführt. Die selektierten Varianten werden durch entsprechende Verfahren vervielfältigt und können ohne vorherige Analyse in einer weiteren Selektion verwendet werden, was beliebig oft wiederholt werden kann. Durch dieses auf dem Prinzip der Evolution basierende Verfahren werden die „besten“ Moleküle angereichert und die „schlechteren“ durch kompetitive Effekte verdrängt. Auch mutagene Komponenten können im Verfahren eingebunden werden, indem bei der Vervielfältigung gezielt Fehler produziert werden, was der natürlichen Evolution noch näher kommt. Voraussetzung für die Funktion einer solchen evolutionären Technologie ist die Replizierbarkeit der Bibliotheks-Komponenten, was eine Kopplung von Phenotyp und Genotyp voraussetzt. Diese Eigenschaft ist bislang biologischen Systemen, wie Zellen und Viren oder Biopolymeren, wie RNA oder DNA vorbehalten. Sie eröffnet die Möglichkeit, theoretisch eine einzige Komponente der Bibliothek zu vervielfältigen und zu analysieren oder die Verluste einer vorangegangenen Selektion auszugleichen, falls die Varianten erneut einer Selektion unterzogen werden sollen. Verschiedene Selektionstrategien, wie Phage-Display, Ribosomen-Display usw. unterscheiden sich dabei im Wesentlichen in der Art der Phenotyp/Genotyp-Kopplung.

Neben Liganden peptidischer Natur sind vor einigen Jahren auch Nukleinsäuren als *in vitro*-selektierbare Stoffe entdeckt worden [34–35]. Bei den sogenannten Aptameren besteht der Phenotyp aus dem selben Molekül wie der Genotyp, nämlich der Nukleinsäure selbst, die durch etablierte enzymatische Methoden vervielfältigt werden kann. Aufgrund dieses geringen biologischen Anspruches bezüglich der Replikation stellt diese Methode Bibliotheken mit den höchsten Diversitäten von bis zu 10^{16} Molekülen zur Verfügung.

Liganden auf der Basis natürlicher Moleküle, wie Antikörper oder Aptamere bergen jedoch verschiedene Nachteile. Zwar können Antikörper mit einer Spezifität für nahezu jedes denkbare Zielmolekül bereits heute unter Zuhilfenahme von *in vitro*-Methoden generiert werden, ihre Produktion erfordert jedoch teilweise anspruchsvolle und pflegeintensive Expressionssysteme, um den Ansprüchen der post-translationalen Modifikation gerecht zu werden. Dies macht die Produktion von Antikörpern langwierig und kostenintensiv. Die begrenzte Stabilität, macht zusätzlich besondere Maßnahmen bei der Verwendung, bei Transport und bei Lagerung hinsichtlich Temperatur, Lösungsbedingungen usw. nötig.

Aptamere sind diesbezüglich einfacher zu handhaben und können theoretisch ebenfalls mit Spezifitäten für jede Zielstruktur hergestellt werden. Ist die Sequenz erst einmal bekannt, gestaltet sich die Produktion von Oligonukleotiden wesentlich einfacher, als die von Antikörpern. Durch etablierte Festphasen-Synthesen können sie in sehr kurzer Zeit und in beliebiger Menge und mit vergleichsweise geringen Kosten dargestellt werden. Auch nach einer Denaturierung hervorgerufen durch thermische oder chemische Einwirkungen nehmen sie unter entsprechenden Bedingungen ihre räumliche, für die Bindung essentielle Struktur wieder ein, wohingegen Antikörper nach einer Denaturierung irreparabel zerstört sind. Dies vereinfacht auch die Lagerung und den Transport von Aptameren. In gefriergetrocknetem Zustand können Oligonukleotide nahezu unbegrenzt gelagert und auch unter widrigen Bedingungen transportiert und eingesetzt werden.

Jedoch ist die Selektion von Liganden aus Nukleinsäuren wie RNA oder DNA teilweise schon aufgrund ihrer chemischen Struktur mit Einschränkungen behaftet. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Aptamere eine Spezifität für ein Zielmolekül besitzen sollen, das selbst Ladungen trägt, da diese mit den negativen Ladungen des Phosphodiesterückgrates in Wechselwirkung treten.

Beide Substanzklassen jedoch, sowohl Liganden proteinischer Natur, als auch Aptamere, sind für den Abbau durch entsprechende Enzyme wie Proteasen bzw. Nukleasen anfällig. Bei Aptameren, insbesondere bei solchen aus RNA, ist der Einsatz in biologischen Flüssigkeiten und damit die Verwendung als Therapeutikum stark eingeschränkt. Daher wurden Möglichkeiten entwickelt, der Degradierung durch Nukleasen entgegenzuwirken. Dies geschieht z.B. durch eine Modifikation der Nukleotide vor oder nach der Selektion [74,179]. Eine Modifikation vor der Selektion darf jedoch die Akzeptanz der Nukleotide durch Polymerasen nicht zu stark einschränken. Nach der Selektion zu modifizieren birgt andererseits die Gefahr, die Struktur und damit auch die Bindungseigenschaften der Aptamere nachhaltig zu verändern oder gar zu zerstören. Auch die Addition struktureller Attribute [180], wie das Anfügen von terminalen Haarnadel-Schleifen oder Nuklease-resistenten Domänen zum

Schutz gegen Exonukleasen bietet keine vollständige Resistenz gegen Degradierung und geht ebenfalls mit der Gefahr einer Änderung der Nukleinsäurefaltung und damit der Bindungseigenschaften einher.

Der Einsatz artifizierter Stoffe in einem evolutionären Selektionsverfahren stellt eine attraktive Alternative zur Benutzung von Biopolymeren dar, da er potenziell die Möglichkeit bietet, die Eigenschaften der Moleküle nach Belieben anzupassen und Nachteile biologischer Verbindungen hinsichtlich begrenzter Stabilität zu umgehen. Voraussetzung dafür ist jedoch die Vervielfältigung einzelner Moleküle dieser Stoffe. Dies kann auch die Ermittlung der Struktur bzw. der Sequenz eines einzelnen Moleküls und dessen Neu-Synthese mit einschließen.

Um die Eigenschaften von Nukleinsäuren für den Einsatz als Hybridisierungs-Sonden oder Gegenstrang-Reagenzien zu optimieren, wurden in zahlreichen Ansätzen Modifikationen natürlicher Nukleinsäuren vorgenommen [181], die teilweise grundlegend andere Strukturen zur Folge hatten. Die Eigenschaft, Hybride zu bilden ist diesen jedoch geblieben, so wie die Fähigkeit intramolekular zu hybridisieren. Liganden aus diesen Verbindungsklassen würden daher die Vorteile von Aptameren hinsichtlich Herstellung, Lagerung, Transport und regenerativer Struktur aufweisen, jedoch würden diese Nukleinsäure-analogen Verbindungen aufgrund der Resistenz gegen Nukleasen eine erhöhte Stabilität insbesondere in biologischen Medien besitzen.

Peptid Nukleinsäuren

Peptid Nukleinsäuren (PNA) sind eine künstlich generierte Verbindung, die bezüglich ihrer Struktur in einer Schnittmenge zwischen natürlichen Nukleinsäuren und Proteinen angesiedelt werden kann. PNA kommt in keinem bekannten biochemischen Prozess vor und stellt auch kein Substrat in bislang bekannten enzymatischen Vorgängen dar. Trotzdem ist Aufgrund der Anwesenheit der Nukleinbasen eine Wechselwirkung mit DNA oder RNA gegeben. Analog zu natürlichen Nukleinsäuren konnten bei PNA ebenfalls intramolekulare Wechselwirkungen der Nukleobasen und folglich auch die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen festgestellt werden. Diese umfassen neben der Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarung und der Schichtung von Nukleobasen, die bei einzelsträngigen Nukleinsäuren üblich sind, noch einige andere weniger konventionelle Arten der Interaktion, die durch das sterisch weniger anspruchsvolle und flexiblere Rückgrat ermöglicht werden. Aus diesem Grund ist die Ausbildung intramolekularer Sekundär- und Tertiärstrukturen auch bei PNA gegeben [137].

Die fehlenden Repulsionskräfte aufgrund der elektrischen Neutralität der PNA tragen zusätzlich zu einer Stabilisierung der Struktur motive bei. Diese Neutralität ist der weitreichendste Unterschied zu natürlichen Nucleinsäuren, da die negative Ladung die chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie Löslichkeit oder chemische Reaktivität weitgehend von der Sequenz unabhängig macht, indem sie die Auswirkungen anderer Wechselwirkungen, wie hydrophobe Interaktionen oder Wasserstoffbrücken dominiert. Daher weisen Nucleinsäuren als chemische Stoffklasse weitgehend konstante Eigenschaften auf [181], die durch marginale Sequenzabweichungen keine extremen Änderungen erfahren, wie sie bei Proteinen auftreten können.

In der Funktion eines Informationsträgers wäre eine elektrische Neutralität des Stranges daher eher nachteilig. Bei der Verwendung von neutralen Nucleinsäure-Analoga zur Selektion von Liganden jedoch, kann diese Eigenschaft als Vorteil gewertet werden, da sie ebenso wie die höhere Flexibilität des Stranges, zu einer größeren Strukturvarianz beiträgt. Weiterhin stellt die Abstößung der Stränge einen gegenläufigen Effekt zur Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen in natürlichen Nucleinsäuren dar, da sie diese destabilisiert. Deswegen stellt die Verwendung von Peptid Nucleinsäuren als Liganden eine interessante Alternative dar. Eine Selektion solcher PNA-Liganden mittels bekannter Verfahren ist jedoch aufgrund mangelnder Akzeptanz durch Enzyme wie Polymerasen nicht möglich.

Die Eigenschaft von PNA, an Nucleinsäuren zu hybridisieren, ermöglicht jedoch den Transfer der Sequenz-Information einer PNA auf eine natürliche und enzymatisch amplifizierbare Nucleinsäuren, die dann einer Sequenzierung unterzogen werden kann, um die ursprüngliche PNA-Sequenz zu ermitteln. Mit einer Sequenzierungs-Technologie für einzelne PNA-Moleküle wäre auch eine Selektion von PNA-Liganden aus einer Bibliothek möglich. Zwar ist auch die Vervielfältigung der PNA problematisch, jedoch könnte die Selektion dabei gegebenenfalls in einem einzigen Schritt durchgeführt werden, wenn die Stringenz der Selektion bei diesem hinreichend hoch ist. Es wäre auch eine Abfolge von Selektionszyklen ohne eingeschobene Vervielfältigung denkbar, wie es von Smith und Anslyn bei der Selektion von DNA-Aptameren durchgeführt wurde [61–62]. Voraussetzung dafür bleibt jedoch die Möglichkeit die Sequenz-Information der selektierten Varianten auch aus einer extrem geringen Menge, im Idealfall aus einem einzelnen Molekül, auslesen zu können.

Jedes PNA-Molekül trägt die Information über seinen Aufbau und die räumliche Struktur in der Abfolge der Nucleobasen in seiner Sequenz. Kann diese ausgelesen werden, so liegt auch hier eine Verknüpfung des Bauplans und der tatsächlichen Struktur und damit eine Phenotyp/Genotyp-Kopplung vor, auch wenn es sich hierbei nicht um Gene im üblichen Sinne handelt. Wenn

weiterhin Möglichkeiten zur Sequenzierung gegeben sind, kann eine Amplifikation durch eine Neu-Synthese der PNA oder durch eine gerichtete DNA-spezifische Synthese durchgeführt werden [182]. Die Amplifikation von PNA und die Selektion sind die Komponenten, die für eine Selektion von PNA-Aptameren analog zum SELEX-Verfahren notwendig sind.

Ziele

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Technologie zur Selektion und Identifikation einer PNA aus einer Bibliothek, die eine Affinität für ein Zielmolekül besitzt. Als Basis hierfür diente eine kombinatorisch chemisch synthetisierte PNA-Bibliothek, deren Komponenten eine Länge von 18 randomisierten Monomeren hatten.

Von Smith und Anslyn konnten DNA-Aptamere selektiert werden, ohne dass eine Amplifikation der selektierten Komponenten während der Selektionsrunden durchgeführt wurde [61–62]. Die Amplifikation der extrem geringen Menge selektierter Komponenten erfolgte nach der letzten Selektionsrunde mit einer hohen Effizienz durch PCR. Auf eingeschobene Amplifikationen zu verzichten wurde durch eine geringere Diversität der eingesetzten Bibliothek ermöglicht. Diese lag in einer Größenordnung von 10^{11} verschiedenen Molekülen und damit unter der, heute benutzter SELEX-Bibliotheken, jedoch noch höher, als das humane Immun-Repertoire. Diese geringere Diversität ermöglichte jedoch die Anwesenheit mehrerer Kopien jeder möglichen Spezies zu Beginn der Selektion und damit ein Ausgleichen der Verluste, die bei einer Selektion ohne Amplifikationen entstanden.

Auf dieser erfolgreichen Selektionsmethode für DNA-Aptamere basierte das Konzept für die Selektion von PNA-Aptameren. Die nicht bindenden Varianten in der Bibliothek sollten durch verschiedene Methoden in einem Schritt oder sukzessive entfernt werden, so dass die PNA-Moleküle mit den gewünschten Bindungseigenschaften erhalten werden konnten.

Daraus ergibt sich eine Aufteilung der Herstellung von Aptameren aus Peptid Nukleinsäuren in zwei Teile. Der erste Hauptteil bestand in der Evaluierung einer Methode, die es ermöglicht, PNA-Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften von den anderen Molekülen der PNA-Bibliothek so effizient wie möglich abzutrennen. Der zweite Teil sah die Entwicklung einer Technologie vor, die es ermöglichte, PNA-Moleküle auch in extrem geringer Menge zu analysieren und die Sequenz zu ermitteln.

Die Komponenten für die Entwicklung

Eine Komponente zur Etablierung einer Selektionstechnologie für PNA-Aptamere bestand aus einer PNA-Bibliothek aus 18 randomisierten Monomeren. Um verschiedene Strategien für die Identifikation selektierter PNA zu ermöglichen, war jedes Molekül der Bibliothek mit einem N-terminal verknüpften Biotinrest versehen, der die Immobilisierung der PNA ermöglichte. Um die Eignung diverser Identifizierungs- und Sequenzierungstechniken für eine unbekannt PNA zu evaluieren, stand ebenfalls eine 18mer PNA zur Verfügung, deren Sequenz bekannt war. Diese enthielt zusätzlich eine reduktiv spaltbare Disulfidgruppe in der chemischen Verbindung zwischen PNA und dem Biotinrest, was eine selektive Trennung von PNA bzw. PNA/DNA-Hybriden von einer festen Phase ermöglichte.

Als zweite Komponente für die Entwicklung einer Selektionstechnologie wurde ein Zielmolekül benötigt. Dieses sollte über eine hinreichende Stabilität verfügen, um eine Degradierung bei Raumtemperatur während der Experimente auszuschließen. Es sollte sich jedoch um ein biologisches Molekül handeln, das idealerweise eine therapeutische Relevanz hat. Weiterhin bot sich für diesen Zweck die Verwendung eines Enzyms an, da hier eine Elution bindender Moleküle mit einem kompetitiven Inhibitor möglich ist. Zudem kann die Bindung so selektierter Moleküle durch einen Aktivitäts-Test des Enzyms nachgewiesen werden, da diese erwartungsgemäß die Aktivität inhibieren würden.

Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus catenulatus* erfüllte diese Voraussetzungen. Die Thermophilie des Enzyms gewährleistete eine hinreichend hohe Stabilität und schränkte so die Gefahr einer Degradierung ein. Die enzymatische Funktion der Dihydrofolatreduktase, für die ein etablierter Aktivitäts-Test zur Verfügung stand und die Verfügbarkeit kompetitiver Inhibitoren ermöglichte zudem die Elution von Liganden aus dem aktiven Zentrum und den späteren Nachweis einer Bindung durch Bestimmung der Aktivität. Die Expression dieses Proteins wurde in *E. coli* durchgeführt, was eine einfache Produktion in ausreichenden Mengen sicherstellte. Die dafür notwendige cDNA war bereits vorhanden, ebenso, wie eine Strategie zur Reinigung des Proteins mittels Affinitäts-Chromatografie unter Benutzung eines angefügten Histidin-Hexamers und Ionenaustausch-Chromatografie.

Etablierung einer PNA-Selektion

Um die Anzahl der nötigen Selektionsrunden gering zu halten, oder idealerweise nach einer einzigen Selektionsrunde die gewünschten Moleküle aus

der Bibliothek zu isolieren, war eine leistungsfähige Methode für die Abtrennung von PNA-Molekülen mit den gewünschten Eigenschaften von der PNA-Bibliothek notwendig.

Der Schritt der Abtrennung nicht tauglichen Bibliotheks-Komponenten bei der Selektion von Liganden mittels evolutionärer Verfahren determiniert die Anzahl nötiger Selektionszyklen für den Erhalt zufriedenstellender Liganden. Je besser die Trennung ist, desto kleiner ist die Anzahl der nötigen Selektionsrunden.

Die übliche Vorgehensweise bei der Aptamer-Selektion hinsichtlich der Bindungseigenschaften besteht darin, die Bibliothek mit dem Zielmolekül in Kontakt zu bringen, so dass sich die Varianten in der Bibliothek, die über die gewünschten Bindungseigenschaften verfügen, an das Zielmolekül anlagern. Anschließend werden die Zielmoleküle zusammen mit den gebundenen Liganden von nicht bindenden Bibliotheks-Komponenten isoliert. Die Affinität selektierter Moleküle kann dabei durch die Menge des Zielmoleküls beeinflusst werden, die in dem Selektionsexperiment zur Verfügung steht. Ist diese größer, werden auch schwächer bindende Varianten der Bibliothek isoliert. Wird die Menge des Zielmoleküls andererseits verringert und damit der Selektionsdruck erhöht, kommen kompetitive Vorgänge stärker zum Tragen und die Affinität der isolierten Binder verbessert sich.

Die Menge des eingesetzten Zielmoleküls einerseits und die Qualität der Trennung nach der Inkubation mit der Bibliothek andererseits sind daher die Parameter, die den Verlauf einer Selektion grundlegend beeinflussen. Werden diese entsprechend optimiert und stehen Technologien zur Verfügung, die die Trennung und die Analyse minimaler Mengen der Komponenten in der Selektion ermöglichen, kann die Anzahl der nötigen Zyklen reduziert werden, so dass auch ein einziger Selektionsschritt ausreichend sein kann.

Die eingesetzte PNA-Bibliothek mit 18 randomisierten Bausteinen beinhaltet eine Diversität von $6,87 \times 10^{10}$ verschiedenen möglichen Varianten. Eine in Experimenten ohne Probleme handhabbare Stoffmenge von 12 nmol entspricht $7,23 \times 10^{15}$ Molekülen und enthält damit statistisch jede mögliche Sequenz der Bibliothek ca. 100.000 mal. Unter Berücksichtigung der Anwesenheit von 100.000 Kopien jedes Moleküls und den oben genannten Zusammenhängen sollte für Selektionsexperimente eine äquimolare Menge des Zielmoleküls eingesetzt werden. Unter der theoretischen Annahme, dass lediglich eine einzige bindende Spezies in der Bibliothek präsent ist und der Voraussetzung einer vollständigen Bindung dieser, bestand die Notwendigkeit, 100.000 PNA/Zielmolekül-Komplexe von den nicht bindenden PNA-Molekülen der Bibliothek abzutrennen. Realistischer ist jedoch, dass mehrere Varianten der Bibliothek in der Lage sind, das Zielmolekül an verschiedenen Epitopen zu binden, so dass sich die Anzahl abzutrennender Bindungskandidaten erhöht. Jedoch liegt auch unter Berücksichtigung dieser Umstände die

nötige Trennungs-Effizienz für eine Selektion von Liganden in einer Runde noch bei etwa 10 Größenordnungen.

Bei der Durchführung des SELEX-Verfahrens besteht die Trennung gewöhnlich in der Kopplung des Zielmoleküls an einer festen Phase. Nach der Inkubation mit der Bibliothek werden nicht gebundene Komponenten durch Waschen entfernt. Obwohl die Immobilisierung der Dihydrofolatreduktase sowohl kovalent, koordinativ als auch unter Verwendung von immobilisierten Inhibitoren erfolgreich vorgenommen werden konnte (Abschnitt 4.1.2), wurde eine Entfernung nicht bindender PNA unter Verwendung immobilisierter Zielmoleküle verworfen, da eine Trennung mit der benötigten Effizienz so nicht gewährleistet werden konnte. Aufgrund einer zu geringen eluierten Stoffmenge der PNA bei diesen Trennungs-Experimenten war eine photometrische Quantifizierung nicht durchführbar. Da auch keine Möglichkeit für eine radioaktive Markierung der PNA gegeben war, stützte sich diese Entscheidung auf empirische Erkenntnisse von RNA-SELEX Experimenten mit radioaktiv markierten Nucleinsäuren in der Arbeitsgruppe und auf Daten, die im Rahmen der Entwicklung einer Technologie zur PNA-Identifikation gewonnen wurden, denn hier musste eine Abtrennung von Nucleinsäuren in analogen Größenordnungen vorgenommen werden, wobei die Trennungseffizienz aufgrund der Menge der nicht entfernten Nucleinsäuren evaluiert wurde, die durch PCR ermittelt werden konnte.

Alternative Trennungsmethoden von Aptamer/Zielmolekül-Komplexen und nicht bindenden Bibliotheks-Komponenten durch Immobilisierung des Zielmoleküls bestehen in chromatografischen oder elektrophoretischen Verfahren. Dabei findet die Bindung von Aptamer-Kandidaten aus der Bibliothek an das Zielmolekül in Lösung statt. Die gelösten Komponenten werden anschließend getrennt. Die Vorteile hierbei liegen in der freien Diffusion des Zielmoleküls und der Liganden, was die Kinetik der Wechselwirkung begünstigt. Weiterhin werden im Gegensatz zu einer Immobilisierung des Zielmoleküls keine Epitope durch eine sterische Abschirmung blockiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde HPLC für die Trennung von Dihydrofolatreduktase und PNA eingesetzt. Dabei wurde thermostabile DHFR als Zielmolekül verwendet. Da keine DHFR-bindende PNA für die Evaluierung der Trennung zur Verfügung stand, wurde mit DHFR und randomisierter 18mer PNA unter der Annahme gearbeitet, dass eine an das Zielmolekül gebundene PNA das Verhalten des Proteins während der Trennung nicht signifikant verändert. Die Trennung wurde unter Verwendung einer Säule mit unpolarer Trennmatrix (C18) vorgenommen. Dabei konnten Bedingungen ermittelt werden, unter denen eine effiziente Trennung von PNA und DHFR möglich war (Abbildung 4.7 auf Seite 70). Obwohl die Trennung der Substanzen unter Verwendung von HPLC mit einer ausreichenden Effizienz

durchgeführt werden konnte, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt, da sie hinsichtlich der Zusammensetzung der Trennpuffer keine große Varianz ermöglichte, um den Ansprüchen der unpolaren Trennmatrix der Säule gerecht zu werden. Bei diesen erfolgt die Elution der Komponenten durch die Erhöhung des Anteils eines organischen Lösungsmittels (üblicherweise Acetonitril) in der mobilen Phase, was sich mit physiologischen Bedingungen, in denen die Aptamere später vorwiegend eingesetzt werden sollten, keineswegs deckt. Für Trennungen im Rahmen von Aptamer-Selektionen ist dieser Umstand ungeeignet, da die Bindungseigenschaften der Liganden unter anderem von der Pufferzusammensetzung abhängig sind und die Selektion daher hinsichtlich der Bindung unter den vorhandenen Bedingungen stattfinden würde. Zwar können in diversen flüchtigen Puffersystemen pH-Werte beliebig justiert werden, jedoch stellt beispielsweise die Verwendung von Salzen im Trennpuffer für HPLC ein Problem bei der Wiedergewinnung der Komponenten dar, da hier eine Entfernung der Salze notwendig werden kann, was bei extrem geringen Mengen der selektierten Moleküle unter Umständen zu kritischen Verlusten führt.

Ein weiteres geeignetes Trennverfahren war die Kapillarelektrophorese, die eine hohe Trennungs-Effizienz im analytischen Maßstab gewährleistet. Weiterhin sind aufgrund des einfachen Aufbaus der Anlage die Trennbedingungen hinsichtlich der Puffer über einen extrem weiten Bereich variabel, so dass problemlos mit physiologischen Puffern gearbeitet werden kann. Die beiden Eigenschaften machen die Kapillarelektrophorese zu einer idealen Methode für die Trennung im Zuge einer Aptamer-Selektion, was bereits bei der Selektion von DNA-Aptameren mit Spezifität für IgE gezeigt werden konnte [59], da hier bereits nach der ersten Selektionsrunde bindende DNA-Moleküle für das entsprechende Zielmolekül bis zu einem Anteil von ca. 60 % angereichert werden konnten.

PNA besitzt jedoch eine elektrisch neutrale Struktur. Damit handelte es sich bei den beiden zu trennenden Komponenten um ungeladene Stoffe, da auch DHFR bei pH-Werten im physiologischen Bereich keine signifikanten Ladungen aufweist. Mit pH-Werten, die sich vom Isoelektrischen Punkt eines Proteins unterscheiden, kann jedoch prinzipiell eine Ladung auf diesem erzeugt werden. Daher wurden in kapillarelektrophoretischen Trennungsansätzen Puffer verwendet, deren pH-Werte über dem Isoelektrischen Punkt der DHFR lagen und negative Ladungen auf dem Protein induzieren sollten. Die PNA enthielt keine deprotonierbaren Gruppen ausser der Carboxylgruppe am C-Terminus. Diese war jedoch zum Amid derivatisiert, so dass die PNA elektrisch neutral vorlag. Bei DHFR konnte so jedoch keine für eine elektrophoretische Trennung ausreichende Ladung generiert werden, und es fand keine signifikante

Migration des Proteins statt. Auch die Verwendung saurer Puffer für die Induktion einer Ladung auf dem Protein brachte nicht den gewünschten Effekt und war mit dem Nachteil einer Protonierung der Aminogruppen der PNA behaftet.

Eine Möglichkeit bestand in der Derivatisierung einer der Komponenten. Daher wurde die Disulfidgruppe an der PNA zum Sulfonat oxidiert (Abschnitt 4.1). Die so erhaltene negative Ladung machte eine elektrophoretische Trennung freier PNA und DHFR möglich. Jedoch müsste in diesem Fall die gesamte PNA-Bibliothek vor der Inkubation mit dem Zielmolekül oxidiert werden, da die Auswirkung der negativen Ladung auf die Bindungseigenschaften unklar sind und eine der Selektion nachgeschaltete Oxidation diese nachhaltig verändern könnte. Ebenso wurden die Nebenreaktionen an der PNA, insbesondere mit den Nukleobasen bei der Oxidation nicht untersucht, konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden, weshalb dieser Ansatz verworfen wurde. Die Generierung einer elektrischen Ladung auf einer der zu trennenden Komponenten konnte jedoch auch durch den Zusatz geladener Stoffe, die ausschließlich entweder mit PNA oder DHFR in Wechselwirkungen traten, erreicht werden. Damit würde eine temporäre, elektrische Ladung auf dem Molekül generiert bzw. es würde in einem konstanten Strom elektrisch geladener Interaktionspartner mitgezogen werden und so eine Migration erfahren.

Als geladene Stoffklasse, bei der ausschließlich eine Wechselwirkung mit der PNA zu erwarten war, kamen Nukleinsäuren oder Nukleotide in Frage. Der Zusatz sowohl von Nukleotiden, als auch von trimeren bis hexameren randomisierten oder komplementären Oligonukleotiden für eine spezifische PNA-Sequenz führte jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis. Die Zugabe von Nukleinsäuren oder Nukleotiden in Konzentrationsbereichen von 50–500 μM , die für einen Effekt nötig waren, führte weiterhin zu einer extrem hohen Absorption im signifikanten Wellenlängenbereich für die Detektion sowohl von PNA, als auch von DHFR. Daher konnte keine Trennmethode basierend auf der PNA/Nukleinsäure-Interaktion etabliert werden.

Bei der MEKC, einer Abwandlung der Kapillarelektrophorese wird dem Trennpuffer eine ionisches Detergenz in einer Konzentration zugesetzt, die über der kritischen Mizellaren Konzentration (CMC) liegt. Die Methode ermöglicht die Trennung ungeladener Substanzen unter Verwendung einer Kapillarelektrophorese-Apparatur. Die Trennung basiert auf der unterschiedlich starken Wechselwirkung der Komponenten mit dem Detergenz (überwiegend SDS) und den Mizellen, durch die auch elektrisch neutrale Substanzen in einer Probe migrieren und voneinander getrennt werden können. Durch dieses Verfahren war auch eine Trennung von PNA und DHFR möglich, jedoch führte die Zugabe des Detergenzes in Konzentrationen über der CMC, die z.B. für

SDS bei > 8 mM liegt, zu einer zumindest partiellen Denaturierung des Proteins. Darüber hinaus verhindert das Detergenz in dieser Konzentration erwartungsgemäß hydrophobe Wechselwirkungen der PNA-Aptamere mit dem Zielmolekül.

In Versuchen bezüglich der Trennung im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Konzentrationen von SDS im Trennpuffer, die bei 0,2 mM und damit weit unter der CMC liegen, ausreichend waren, um eine Ladung auf der DHFR zu generieren, die zu einer Migration dieser führte und für eine Trennung ausreichend war. Die enzymatische Aktivität der DHFR war bei Anwesenheit von 0,01 % (0,35 mM) nicht signifikant erniedrigt (Abbildung 4.10 auf Seite 73), was auf einen nativen Zustand des Proteins hinwies. Auch hydrophobe Wechselwirkungen durften in diesem Konzentrationsbereich noch hinreichend gegeben sein. PNA migrierte aufgrund geringerer Wechselwirkung mit SDS nicht oder vergleichsweise sehr langsam und konnte auch nach der 10-fachen Laufzeit der DHFR nicht detektiert werden.

Diese Methode, bei der ausschließlich eine von zwei Komponenten eine detektierbare Wanderungsgeschwindigkeit besitzt, stellt eine extrem effiziente Trennungsmethode dar, die der von Mendonsa *et al.* [59] benutzten Methode hinsichtlich der Effizienz nahe kommt und eine hohe Anreicherung bindender Bibliotheks-Komponenten nach der ersten Runde ermöglicht. Ferner basiert die hier entwickelte Methode nicht auf der Größe des Zielmoleküls, sondern auf dessen chemischer Beschaffenheit und der damit verbundenen Interaktion mit dem Detergenz und ist damit vermutlich größenunabhängig auf alle proteinischen Zielmoleküle anwendbar. Testläufe unter Verwendung von BSA zeigten zur DHFR kongruente Ergebnisse. Da auch hier keine bindende PNA für die Evaluierung der Trennung zur Verfügung stand, wurde für den Einsatz der Trennung in einer Selektion postuliert, dass eine an das Zielmolekül gebundene PNA das Verhalten des Proteins während der Trennung nicht signifikant verändert.

Mit dieser auf Detergenzien basierenden nicht-mizellaren Trennungsmethode von Proteinen und DHFR steht somit eine fundamentale Komponente für die Selektion von PNA-Aptameren zur Verfügung.

Identifizierung unbekannter PNA

Unentbehrlich für die Selektion von Liganden mittels kombinatorischer Verfahren ist die Identifikation der selektierten Komponenten. Ein weiteres Ziel im Rahmen der Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode für die Sequenz-Analyse von PNA-Molekülen in geringen Mengen. Grundlage dafür war der Transfer der PNA-Sequenzinformation auf eine DNA, die amplifiziert

und sequenziert werden konnte und so die Möglichkeit eröffnen würde, bereits geringe PNA Mengen zu untersuchen.

Hybridisierung der PNA an eine DNA-Bibliothek

Der erste Ansatz sah zunächst die Hybridisierung der nach der Selektion vorhandenen PNA an komplementäre Gegenstücke aus einer ssDNA Bibliothek vor. Diese verfügte mit 18 randomisierten Nukleotiden über die gleiche Diversität, wie die verwendete PNA-Bibliothek (ca. 7×10^{10}) und war zudem mit zwei flankierenden Primer-Bindungsstellen bekannter Sequenz versehen. Die erhaltene PNA aus einer Selektion sollte mit einer ssDNA-Bibliothek versetzt werden, in der jede mögliche Sequenz ca. 100.000 mal vorhanden war. Für die Hybridisierung der PNA an die passende DNA wurden lange Inkubationszeiten vorgesehen, um der Kinetik der Hybridisierung Rechnung zu tragen, die angesichts der geringen Menge von 100.000 Hybriden entsprechend langsam ablaufen würde. Nach der Trennung der PNA/DNA-Hybride von der nicht hybridisierten ssDNA, sollte die DNA der Hybride in einer PCR amplifiziert und nachfolgend kloniert und sequenziert werden (Abbildung 4.13 auf Seite 75).

In den Experimenten, in denen dieses Konzept evaluiert werden sollte, wurde eine 18mer PNA bekannter Sequenz eingesetzt, um die später erhaltenen DNA-Sequenzen abgleichen zu können. Die Anzahl der eingesetzten PNA-Moleküle betrug 100.000 Moleküle und war damit äquimolar zu der statistischen Anzahl passender Gegenstücke in der eingesetzten DNA-Bibliothek. Hinsichtlich der Trennung bei diesem Ansatz zur PNA-Sequenzierung stellte sich ein Problem, das analog zu dem bei der Trennung von PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexen war. 10^5 entstandene PNA/DNA-Hybride standen hierbei 10^{15} DNA-Molekülen gegenüber, die eine andere Sequenz im randomisierten Abschnitt besaßen und nicht an der PNA hybridisieren konnten. Diese stellen jedoch gleichermaßen eine Vorlage in der nachfolgenden PCR dar, da alle Bibliotheks-Komponenten über die gleichen Primer-Bindungsstellen verfügten. Aufgrund dieser Tatsache war eine Trennung von ssDNA und PNA/DNA-Hybriden über zehn Größenordnungen nötig.

Versuche, die PNA/DNA-Hybride durch Immobilisierung der PNA an einer Matrix und anschließendem Waschen von nicht hybridisierter ssDNA abzutrennen, schlugen fehl, da durch dieses Verfahren keine Trennung mit der entsprechenden Effizienz erreicht werden konnte. Dies zeigte sich in der Präsenz von Amplifikaten nach der PCR in allen Ansätzen unabhängig von der An- oder Abwesenheit der PNA. Weiterhin führte die Zugabe sämtlicher verwendeter Trägermaterialien zu einer Inhibierung der PCR, was eine vorhergehende Elution der DNA von der PNA nötig machte. Diese Elution durch Denaturierung der PNA/DNA-Hybride wurde sowohl thermisch als auch chemisch

durchgeführt. Sie verlief jedoch unspezifisch, so dass stets Nukleinsäuren von der Matrix eluiert wurden, die dort unspezifisch gebunden waren und durch Waschen nicht entfernt werden konnten. Die Elution durch chemische Denaturierung machte weiterhin eine Aufreinigung bzw. ein Wechsel der Puffer nötig, der stets mit Verlusten der DNA und mit der Verunreinigung der Proben durch nicht komplementäre DNA verbunden war.

Nachfolgend wurden daher Komponenten in die Abtrennung von DNA und PNA/ DNA-Hybriden eingebracht, die eine Elution der Hybride durch spezifische chemische Spaltung der Verknüpfung zwischen PNA und Biotingruppe erlaubten. Die Verwendung von PNA/DNA-Hybriden als Vorlage in der PCR stellte kein Problem dar, da die DNA während der primären Denaturierung bei der PCR thermisch von der PNA dissoziiert wurde.

Obwohl für diese Art der Elution der PNA/DNA-Hybride weniger harsche Bedingungen notwendig waren, als für die Elution durch thermische oder chemische Denaturierung der PNA/DNA-Hybride, konnte jedoch die Kontamination der Ansätze durch unspezifisch an die Matrix gebundene DNA nicht verhindert werden. Weiterhin war aufgrund der Zugabe des Reduktionsreagenzes (DTT) für die reduktive Elution der PNA wiederum ein Austausch des Puffers vor der Amplifikation notwendig. Dies wurde mittels einer Gel-filtration durchgeführt, was einen partiellen Verlust der PNA/DNA-Hybride mit sich brachte.

Ein weiterer Ansatz bezüglich der Trennung der PNA/DNA-Hybride und der nicht hybridisierten DNA bestand in der Verwendung chromatografischer Verfahren. Eine kapillarelektrophoretische Trennung konnte hier nicht angewandt werden, da die zu trennenden Proben zu große Volumina hatten, um diese präparativ in einer Kapillarelektrophorese zu trennen. Daher wurde eine HPLC-Trennung etabliert. Für diese konnten Trennungsbedingungen ermittelt werden, die eine Separierung der PNA/DNA-Hybride und freier ssDNA erlaubten (Abbildung 4.20 auf Seite 82). Da die Hybridisierung von PNA an DNA weitestgehend Ionen-unabhängig ist [124], konnte auch auf den Zusatz von Salzen verzichtet und die Fraktionen später durch Gefrier-trocknung eingengt werden. Bei der Abtrennung der PNA/DNA-Hybride im Zuge einer Selektion von PNA aus einer entsprechenden Bibliothek würden diese jedoch in Mengen vorliegen, die kein Absorptions-Signal im Detektor erzeugten. Gleichzeitig erhöhte sich die Menge der freien DNA drastisch. Diese Umstände erforderten zum einen eine sehr effiziente Trennung zum anderen eine hohe Reproduzierbarkeit, da für die gewünschte Fraktion kein Signal erhalten würde und diese somit lediglich anhand der Retentionszeit abgefangen werden müsste. Daher wurde wie bei der oben diskutierten Trennung von PNA/Zielmolekül-Komplexen und freier PNA eine sprunghafte Änderung der

Laufmittelzusammensetzung verwendet, die zu einer Elution an einem definierten Zeitpunkt führte (Abbildung 4.21 auf Seite 83). Obwohl diese Trennung funktionierte, konnte damit keine PNA-Sequenz ermittelt werden.

Die Problematik lag bei dieser HPLC-Trennung grundlegend in den extrem unterschiedlichen Stoffmengen der zu trennenden Komponenten. Einerseits der lediglich in Spuren vorhandenen Hybride, andererseits der verhältnismäßig großen Menge freier DNA, die im Bereich von ca. 200 µg lag. Die Abmessungen der Trennsäule stellte daher einen Kompromiss zwischen ausreichender Kapazität und einem hinreichend geringen Lösungsmittel-Fluss dar, um die marginalen Mengen der PNA/DNA-Hybride nicht aus zu großen Volumina extrahieren zu müssen. Es konnte gezeigt werden, dass die gesuchten Hybride sich nicht in einer der untersuchten Fraktionen befanden (Abbildung 4.22 auf Seite 83). Ob diese während der Fraktionierung und der Gefriertrocknung, beispielsweise durch Adsorption an Gefäßwände, oder während der Chromatografie durch unzureichende Trennung verloren gingen, konnte nicht eruiert werden. Aufgrund der DNA-Menge, die die Kapazität der HPLC-Säule ausreizte, war die Ursache für die gescheiterte Abtrennung der Hybride jedoch vorwiegend bei der Chromatografie zu suchen. Eine Alternative bestand in der Verwendung größerer Trennsäulen, die jedoch die Wiedergewinnung der Hybride aufgrund höherer Flussraten und damit verbundenen größeren Volumina der Fraktionen erschweren würde. Obwohl diese Methode Vorteile hinsichtlich des Zeitaufwands und der nicht genutzten Biotingruppe an der PNA bot, die danach z.B. für Wechsel der Reaktionspuffer zur Verfügung stünde, wurde die chromatografische Abtrennung der PNA-komplementären DNA nicht weiter verfolgt.

Ebenso problematisch wie die Abtrennung der komplementären DNA von der Bibliothek, war jedoch die Kontamination der Ansätze durch DNA-Spuren, die durch die Handhabung der DNA-Bibliothek am Arbeitsplatz und mit den selben Pipetten verursacht wurde. Durch die Verwendung von Filterpipettenspitzen und der räumlich getrennten Herstellung der PCR-Ansätze konnte dieses Problem nur teilweise bzw. temporär gelöst werden, da die DNA-Bibliothek und damit auch die Vorlagen für die PCR in hohen Konzentrationen von bis zu 1 mM verwendet wurde und da keine Möglichkeiten zur effizienten Separierung dieser Versuche vorhanden war. Eine Abtrennung der PNA-komplementären DNA von nicht hybridisierter DNA lediglich auf der Basis physikalischer Methoden wurde daher verworfen.

Enzymatischer Abbau nicht hybridisierter DNA

Aufgrund der zu geringen Trennleistung bei der Verwendung physikalischer Trennungsmethoden wurden ergänzend enzymatische Methoden entwickelt, die es erlaubten, nicht an PNA hybridisierte DNA-Moleküle aus der Bibliothek spezifisch abzubauen. Ein Verzicht auf die physikalische Abtrennung freier DNA und der Beseitigung der gesamten nicht hybridisierten Bibliothek lediglich durch enzymatische Methoden erschien nicht sinnvoll. Daher sollten enzymatische Verfahren nach der physikalischen Trennung eingesetzt werden, um die restlichen nicht hybridisierten Bibliotheks-Komponenten zu entfernen. Der erste Ansatz diesbezüglich sah den Einsatz der einzelstrangspezifischen S1 Nuklease vor. Diese hydrolysiert spezifisch einzelsträngige DNA. DNA-Doppelstränge werden nicht hydrolysiert und PNA/DNA-Hybride sind gegen die Degradierung durch S1 Nuklease ebenfalls resistent, was in verschiedenen Experimenten gezeigt werden konnte und bereits beschrieben wurde [100]. Um die Primerregionen der DNA-Bibliothek-Komponenten zu schützen wurden komplementäre Oligonukleotide in einem Überschuss zugesetzt, so dass lediglich die randomisierten Bereiche der Bibliotheks-Komponenten für eine Hydrolyse zugänglich waren, wenn keine komplementäre PNA an sie hybridisiert war (Abbildung 4.24 auf Seite 86). Der enzymatische Abbau für die Sequenzanalyse wurde mit 100.000 PNA-Molekülen evaluiert.

Die Experimente zeigten, dass bei Zugabe von S1 Nuklease zu diversen Matrices an denen die PNA/DNA-Hybride immobilisiert waren, kein hinreichender effektiver Abbau freier DNA möglich war, da auch bei Kontrollansätzen ohne PNA Amplifikate nach der PCR erhalten wurden. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass unspezifisch an die Matrix gebundene DNA für eine enzymatische Hydrolyse nicht zugänglich war und bei der Elution der DNA ebenfalls abgelöst wurde. Der nächste Schritt bestand daher in der reduktiven Spaltung der Disulfidbrücke an der PNA vor dem enzymatischen Abbau. In Lösung war eine bessere Diffusion der Komponenten gewährleistet und damit eine enzymatische Degradierung nicht hybridisierter DNA wesentlich effizienter, so dass eine vollständige Entfernung dieser möglich war. Aufgrund der unterschiedlichen Ansprüche bezüglich der Pufferzusammensetzung für S1 Nuklease und den verwendeten DNA-Polymerasen, war jedoch wiederum ein Austausch des Puffers vor der Amplifikation nötig. Wie oben erwähnt war dieses Verfahren jedoch anfällig sowohl für den partiellen Verlust der Vorlage bei der Gelfiltration als auch für Kontaminationen durch ssDNA aus der Bibliothek.

Durch dieses Verfahren aus Hybridisierung, Immobilisierung, Waschen, Elution und enzymatischem Abbau konnte DNA aus der Bibliothek isoliert und kloniert werden, die eine der PNA komplementäre Sequenz aufwies (Seite 90).

Ob diese Übereinstimmung der erhaltenen Sequenz mit der erwarteten Sequenz auf Kontamination mit Oligonukleotiden zurückzuführen war, die jene Sequenz enthielten, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, da entsprechende DNA vorhanden war, und da die Reproduktion des Ergebnisses aufgrund von Kontaminationen mit DNA aus der Bibliothek nicht gelang. Da die eingefügte DNA der erhaltenen Klone und die, der Positivkontrolle in entgegengesetzten Orientierungen in den Plasmiden lagen (Abbildung 4.30 auf Seite 92), erschien dies jedoch unwahrscheinlich, denn eine Kontamination mit entsprechenden Oligonukleotiden zum Zeitpunkt der Klonierung und der Transformation konnte somit ausgeschlossen werden.

Das Verfahren war nicht ausreichend reproduzierbar, so dass DNA-Kontaminationen, die im Verlauf des Prozesses in die Probe gelangten, auch bei Abwesenheit von PNA zu Amplifikaten führten. Andererseits wurden teilweise auch bei Anwesenheit von PNA keine Amplikate erhalten, was auf eine zu geringe Spezifität der S1 Nuklease zurückgeführt wurde, die möglicherweise aufgrund partieller Denaturierung der Schutzoligonukleotide für die Primer-Bindungsstellen zur Hydrolyse der DNA führte und somit die Amplifikation der DNA verhinderte.

Die Aufreinigung der PNA/DNA-Hybride nach der reduktiven Elution von der festen Phase beinhaltete stets die Gefahr einer Kontaminationsmöglichkeit. Um dies zu verhindern, sollte ein Verfahren entwickelt werden, in dem die enzymatische Degradierung und die Amplifikation der DNA nacheinander in einem geschlossenen System stattfinden konnte. S1 Nuklease war auch in einem PCR-Puffer noch partiell aktiv und führte bei höheren Enzymmengen zur Degradierung einzelsträngiger DNA. Damit war prinzipiell eine Degradierung der nicht hybridisierten DNA in einer PCR-Reaktion möglich, jedoch würde S1 Nuklease gleichermaßen zu einem Abbau der für die PCR notwendigen Primer führen. Dies machte eine nachträgliche Zugabe dieser und damit wiederum ein Eingreifen in das System nötig, wodurch die Gefahr einer Kontamination wieder gegeben war.

Durch ein System aus zwei Puffern, die durch eine Wachsschicht getrennt waren (Abbildung 4.33 auf Seite 95) und eine Mischung vor einer Amplifikation ohne Eingriff in das System erlaubten, konnte gezeigt werden, dass der Abbau von nicht hybridisierter DNA durch S1 Nuklease prinzipiell möglich war (Abbildung 4.27 auf Seite 89). Auch stand mit diesem System eine Methode zur Verfügung, um die spezifische enzymatische Degradierung und die Amplifikation von komplementärer DNA ohne Eingriff in einem geschlossenen System durchzuführen, wobei der Puffer in einem Kompartiment für die jeweilige Nuklease optimiert werden konnte. Jedoch war der enzymatische Abbau freier DNA ab einem Hintergrund von 10^8 DNA-Molekülen nicht mehr effizient genug, so dass in der anschließenden PCR auch ohne Zugabe

von PNA Amplifikate erhalten wurden. Es war ebenfalls nicht auszuschließen, dass Spuren von DNA in der Wachsschicht eingeschlossen und so vor der Degradierung geschützt wurden. Nachteilig war weiterhin, dass Kontaminationen, die sich im Kompartiment der PCR-Komponenten befanden ebenfalls nicht der spezifischen enzymatischen Degradierung zugänglich waren.

Bei einer enzymatischen Degradierung der nicht hybridisierten DNA in einer PCR-Reaktionsmischung musste in erster Linie sichergestellt werden, dass weder die Primer, noch an PNA hybridisierte DNA vom Enzym abgebaut wurden. Eine weitere Möglichkeit hierfür bestand im Einsatz von Restriktionsendonukleasen, die eine Aktivität in PCR-Puffer aufwiesen. Aufgrund der Sequenz- und Doppelstrang-Spezifität dieser Enzyme bestand nicht die Gefahr die im Ansatz vorhandenen einzelsträngigen Primer abzubauen. Weiterhin konnte die Anwesenheit einer PNA die Restriktion der Bibliothekskomponenten unterbinden. Für diesen Zweck wurde die Restriktionsendonuklease XbaI gewählt, wobei eine direkte Proximität der PNA zur Erkennungssequenz des Enzyms eine Restriktion der DNA nicht verhindern konnte (Abbildung 4.37 auf Seite 99).

Durch die Präsenz einer PNA konnte jedoch die Elongation eines 3'-Primers verhindert werden, so dass bei einer Erkennungssequenz am 5'-Ende der DNA-Bibliothek eine spezifische Hydrolyse in Abhängigkeit einer PNA vorgenommen werden konnte (Abbildung 4.39 auf Seite 101). Damit war eine Möglichkeit gegeben, die 5'-Primerregion einer nicht an PNA hybridisierten ssDNA spezifisch mit enzymatischen Methoden in einem PCR-Ansatz abzuspalten, so dass eine Amplifikation dieser nicht mehr stattfinden konnte.

Alternativ wurde die Typ II's Restriktionsendonuklease MlyI verwendet [183]. Damit war die Möglichkeit gegeben, die DNA-Bibliothek so zu gestalten, dass die Hydrolyse Sequenz-unabhängig im randomisierten Bereich der DNA stattfand. Die Restriktion wurde bei Anwesenheit einer passenden PNA daher durch zwei Faktoren unterbunden. Zum einen blockierte die PNA wiederum die Elongation des 3'-Primers, wodurch die DNA in der Erkennungssequenz der Nuklease einzelsträngig vorlag und nicht als Substrat akzeptiert wurde, zum anderen verhinderte die hybridisierte PNA die Restriktion an sich [168]. Der spezifische enzymatische Abbau konnte durch Benutzung dieser Methode daher im PCR-Reaktionsansatz stattfinden. Weiterhin waren die verwendeten Restriktionsendonukleasen problemlos thermisch inaktivierbar, so dass keine Gefahr einer Restriktion der amplifizierten DNA nach der PCR bestand.

Obwohl die Degradierung durch MlyI die nötige Spezifität aufwies, was in Verdauungsansätzen, in denen entsprechende Oligonukleotide in Konzentrationen von je 1 μM vorhanden waren, gezeigt werden konnte (Abbildung 4.43 auf Seite 103), verlief die Verdauung durch MlyI für den vollständigen Abbau freier DNA nicht hinreichend effizient. Bei einem Hintergrund von 10^7

Molekülen freier ssDNA wurde auch nach 18 h Inkubation mit MlyI und einer nachfolgenden PCR ein Amplifikat erhalten, obwohl keine PNA vorhanden war (Abbildung 4.45 auf Seite 104). Auch die Verwendung des Typ II Restriktionsenzym BseRI in gleicher Weise führte nicht zu den erwarteten Ergebnissen.

Synthese komplementärer DNA an der PNA

Im Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung komplementärer ssDNA der vollen Länge aus einer Bibliothek an eine PNA und deren anschließende Amplifikation mit mehreren Problemen behaftet war. Zum einen war die geringe Menge problematisch, in der die komplementäre DNA in der Bibliothek vorhanden war. Um die Effizienz der Hybridisierung und damit der PNA-Identifizierung zu optimieren, sollte die DNA-Bibliothek in einer Stoffmenge zugesetzt werden, die statistisch mindestens eine zur vorhandenen PNA äquimolare Menge komplementärer DNA enthielt. Mehr als 10^5 Kopien pro Sequenz-Spezies waren jedoch sowohl aus technischen Beschränkungen, als auch aus Kostengründen hierbei nicht möglich.

Ein weiteres und schwerwiegenderes Problem bestand in der Abtrennung der PNA-komplementären DNA bzw. der PNA/DNA-Hybride von nicht hybridisierter DNA. Die grundlegende Problematik war hier, dass alle Bibliotheks-Komponenten eine Vorlage für die nachgeschaltete Amplifikationsreaktion darstellen. Dies erforderte eine extrem effiziente und spezifische Trennung, wenn nur PNA-komplementäre Sequenzen erhalten werden sollten.

Die Synthese komplementärer DNA an einer PNA stellt eine potenzielle Lösung für die beiden oben genannten Probleme dar, denn diese beruht auf der Verknüpfung von Bausteinen, die aus einem oder mehreren Nukleotiden bestanden. Dadurch konnte zum einen die Herstellung einer PCR-Vorlage an die Anwesenheit einer PNA geknüpft werden und somit der vorhandene Hintergrund bestehend aus DNA, die zwar amplifiziert werden konnte, jedoch die falsche Sequenz besaß, wesentlich reduziert werden. Zum anderen wiesen die Bausteine eine geringere Länge, als die zu untersuchende PNA auf und konnten damit auch in einer randomisierten Bibliothek in einer höheren Kopienzahl pro möglicher Spezies im Vergleich zu einer Bibliothek mit der vollen Länge vorliegen.

Beispielsweise beträgt die Diversität einer Bibliothek mit 18 randomisierten Nukleotiden $4^{18} = 6,87 \times 10^{10}$. Bei neun randomisierten Positionen beträgt die Anzahl der möglichen Kombinationen lediglich noch $4^9 = 262.144$. Dies führt bei gleicher Stoffmenge zu einer Erhöhung der Kopienzahl für jede Spezies

um einen statistischen Faktor von 262.144, wobei diese Zahl mit abnehmender Größe der Fragmente exponentiell zunimmt.

Chemische Verfahren

Für die Synthese einer cDNA an der PNA war eine Methode erforderlich, die es erlaubte, die hybridisierten DNA-Bausteine untereinander zu verknüpfen. Da aufgrund der artifiziellen Struktur der PNA und damit auch der entsprechenden Hybride enzymatische Verfahren zunächst nicht sinnvoll erschienen, wurde die Kopplung der Bausteine chemisch mit wasserlöslichen Carbodiimiden (EDC) [173] oder Cyanogenbromid durchgeführt [174,184–185].

Die Verknüpfung konnte sowohl mit EDC, als auch mit Cyanogenbromid erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 4.48 auf Seite 107 und Abbildung 4.49 auf Seite 108). Generell führte die chemische Ligation bei der Verwendung einer DNA-Vorlage zu höheren Ausbeuten, als bei einer PNA-Vorlage. Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der geringeren Flexibilität des DNA-Rückgrates im Gegensatz zu PNA, was zu einer näheren räumlichen Lage der zu ligierenden Enden und damit zu einer schnelleren Reaktion führte. Jedoch konnten auch bei Verwendung von PNA-Vorlagen und Cyanogenbromid als Kopplungsreagenz Ligationsprodukte in detektierbaren Mengen erhalten werden. Bei Abwesenheit der Ligationsvorlagen war die Ausbeute signifikant geringer, obwohl die chemische Verknüpfung der DNA auch zwischen frei in Lösung diffundierenden Fragmenten stattfinden konnte. Auch wurden keine Produkte detektiert, die länger als zwei DNA-Fragmente waren, obgleich auch die Bildung von Ketten aus drei und mehr Fragmenten unabhängig einer Vorlage stattfinden konnte. Aufgrund des starken Einflusses der Ligationsvorlage schien eine Identifizierung der PNA durch eine gerichtete Ligation von DNA-Fragmenten vielversprechend.

Im weiteren Verlauf sollte daher eine Sequenz-Analyse der PNA durch gerichtete Ligation zweier partiell randomisierter Oligomere durchgeführt werden. Deren Schmelztemperaturen eine Hybridisierung erlaubten (Abbildung 4.47 auf Seite 106). Für diese Versuche wurde im folgenden ausschließlich Cyanogenbromid verwendet, da dieses zu höheren Ausbeuten bei der Verwendung von PNA-Vorlagen führte und da die Reaktionszeit von einigen Minuten wesentlich kürzer war, als die für EDC von einigen Stunden. Die nicht komplementäre DNA wurde entweder vor oder nach der chemischen Verknüpfung entfernt, wobei die Biotingruppe der PNA genutzt wurde, um die Hybride zu immobilisieren.

Bei einer chemischen Ligation vor Entfernung der nicht-hybridisierten Oligonukleotide war der Hintergrund jedoch so hoch, dass Amplifikate auch ohne

die Anwesenheit einer Ligationsvorlage erhalten wurden (Abbildung 4.55 auf Seite 115). Durch Entfernen der nicht-hybridisierten Oligomere vor der chemischen Verknüpfung (Abbildung 4.56 auf Seite 116) konnten homologe Sequenzen erhalten werden (Tabelle 4.1 auf Seite 110), die mit 20–25 Nukleotiden länger waren, als die erwartete Sequenz, jedoch einen Abschnitt von sieben Nukleotiden aufwiesen, der bei einer parallelen Hybridisierung komplementär zur PNA war. Diese Hybridisierungsrichtung ist bei PNA/DNA-Hybriden zwar möglich, jedoch nicht bevorzugt. Weiterhin stellte der fragliche Sequenzabschnitt 5'-GCAATTA-3' mit einem GC-Anteil von lediglich 29% einen eher schlecht hybridisierenden Teil dar, weshalb die Entstehung dieses Sequenzmotives durch die Ligationsvorlage nicht mit Sicherheit bestätigt werden konnte. Auch konnte die Varianz in der Anzahl der Nukleotide zwischen den Primerregionen nicht geklärt werden, jedoch trat dieses Phänomen bei allen DNA-Sequenzen auf, die aus chemisch ligierter DNA unter Verwendung von Cyanogenbromid hervorgegangen waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass Nukleotide oder ganze DNA-Abschnitte durch Nebenreaktionen des Cyanogenbromides sowohl degradiert, als auch hinzugefügt werden konnten.

Enzymatische Verfahren

Die auftretenden Nebenreaktionen bei der Verwendung von Cyanogenbromid als Kopplungsreagenz für DNA-Fragmente legten die Suche nach einer milderen Ligationsmethode nahe. Obwohl auf die Verwendung von enzymatischen Methoden vorerst verzichtet wurde, da es sich bei PNA um eine artifizielle Verbindung handelt und eine Akzeptanz der PNA als Substrat unwahrscheinlich schien, wurden im Rahmen der Arbeit einige Ligasen auf ihr Vermögen hin untersucht, an PNA hybridisierte DNA zu ligieren. Die doppelstrangspezifische T4 DNA Ligase und die ebenfalls doppelstrangspezifische und thermostabile Taq DNA Ligase waren jedoch nicht für diese Ligationen einsetzbar (Seite 112). Der Grund hierfür lag vermutlich in der Doppelstrangspezifität, die den nicht zu ligierenden komplementären Strang in die Substraterkennung einschließt [186–187]. Dadurch wurden PNA/DNA-Hybride nicht als Substrat akzeptiert, auch wenn die zu ligierende DNA eine natürliche Struktur besaß. Diese Hypothese wurde von der Erkenntnis gestützt, dass eine Ligation von hybridisierter DNA an PNA unter Benutzung der einzelstrangspezifischen T4 RNA Ligase möglich war. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Experimenten, erstmals jedoch mit einem Modellsystem aus PNA und zwei partiell komplementären 24mer Oligonukleotiden gezeigt werden (Abbildung 4.54 auf Seite 114). Aufgrund der Spezifität für einzelsträngige Nukleinsäuren fand dabei jedoch keine Ligation der Oligonukleotide an einer DNA-Vorlage statt. Es war lediglich eine Ligation von DNA

an der PNA-Vorlage und von freier ssDNA in Lösung möglich, jedoch war die Ausbeute der Ligation ohne Vorlage, ähnlich wie bei der chemischen Ligation so gering, dass keine Ligationsprodukte in der PAGE-Analyse detektiert werden konnten, was ebenfalls auf eine stark bevorzugte Ligation von proximal an PNA hybridisierten Oligonukleotiden zurückzuführen war.

Mit dieser enzymatischen Ligation steht eine Methode zur Verfügung, die die Synthese von komplementärer DNA an einer PNA unter milden Reaktionsbedingungen erlaubt. Unter Verwendung dieser enzymatischen Verknüpfung wurden daher analog zur chemischen Ligation Versuche mit partiell randomisierten Oligonukleotiden durchgeführt, die nach einer Hybridisierung an PNA ligiert wurden. Beim Einsatz von zwei Oligonukleotiden mit definierter Sequenz, die komplementär zu jeweils einer Hälfte der PNA waren, konnten Amplifikate der Ligationsprodukte in Abhängigkeit der An- bzw. Abwesenheit von 10^7 PNA-Molekülen erhalten werden (Seite 114). Dieses Ergebnis konnte allerdings nicht in Experimenten reproduziert werden, in denen partiell randomisierte Oligomere eingesetzt wurden (Seite 116). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Ausbeute der Ligationsreaktionen hier wesentlich geringer war. Die Ursache dafür lag vermutlich in erster Linie in der Hybridisierung der DNA-Fragmente an die PNA. Während bei Nutzung von ausschließlich komplementären Oligonukleotiden nahezu die gesamte PNA an passende DNA hybridisiert war, lagen bei Verwendung einer Bibliothek die komplementären DNA-Fragmente nur in wesentlich geringeren Mengen vor. Dies hatte eine schlechtere Kinetik der Hybridisierung und eine Kompetition durch Oligonukleotide mit anderen Sequenzen zur Folge. Der Umstand, dass nur ein Teil der PNA an den passenden komplementären DNA-Fragmenten hybridisierte, führte demnach auch zu schlechteren Ausbeuten bei der Ligation. Die reduzierte Menge, die als PCR-Vorlage zur Verfügung stand, zeigte sich auch in der Notwendigkeit, in der PCR mehr Zyklen zu durchlaufen, um detektierbare Amplifikate zu erhalten. Während bei der Nutzung von DNA-Oligomeren mit definierter zur PNA komplementärer Sequenz 20–25 Zyklen ausreichten, waren für die Amplifikation der DNA nach Hybridisierung an eine Bibliothek 35–40 Zyklen nötig um äquivalente DNA-Mengen zu erhalten. Dadurch nahm ebenfalls der Einfluss des Hintergrundes, d.h. von unspezifisch ligierter DNA oder Kontamination durch DNA, in der PCR zu. Bei Versuchen, die PNA-Sequenz durch Hybridisierung an zwei DNA-Fragmente und anschließender Ligation zu ermitteln, wurden daher stets Amplifikate in Negativkontrollen erhalten, die keine PNA enthielten. Diese waren zwar im Allgemeinen schwächer als die Amplifikate aus PNA-enthaltenden Ansätzen, jedoch überdeckten sie die gesuchte DNA, so dass die erwarteten Sequenzen nicht erhalten wurden.

Ein Ansatz zur Lösung dieser Problematik bestand in der Verringerung der Fragmentgröße für die DNA-Synthese. Kleinere Fragmente bieten den Vorteil einer geringeren Diversität und damit eine größere Präsenz jeder möglichen Sequenz in einer randomisierten Bibliothek. Daher wurde im weiteren Verlauf die Ligation von Hexameren, Pentameren und Tetrameren an einer PNA-Vorlage evaluiert. Diese Ligation führte unter Verwendung spezifischer und komplementärer hexamerer und pentamerer ssDNA zu Ausbeuten der Ligationsprodukte, die ohne eine Amplifikation in einer PAGE detektiert werden konnten (Abbildung 4.61 auf Seite 119). Ligation von tetramerer ssDNA führte zu keinen detektierbaren Ausbeuten, was auf eine unzureichende Stabilität der Hybridisierung der Tetramere an der PNA zurückgeführt wurde. Die Tetramer-Ligation an PNA mit T4 RNA Ligase war dennoch möglich und ebenfalls sequenzspezifisch durchführbar, was durch das Auffüllen einer tetrameren Lücke zwischen zwei an eine PNA hybridisierte Oligonukleotide und anschließender Amplifikation des Ligationsproduktes gezeigt werden konnte (Seite 120). Damit konnte auch erstmals eine DNA erzeugt werden, die der erwarteten PNA-komplementären Sequenz entsprach. Die Erweiterung des zu ermittelnden Abschnittes auf acht Nukleotide führte zu einer direkten Ligation der flankierenden Oligonukleotide aneinander, die eine Konkurrenzreaktion zur Ligation kürzerer Fragmente darstellte, da sie ebenfalls zur Bildung einer PCR-Vorlage führte (Seite 124). Auch die Ligation von ssDNA-Dimeren in eine tetramere oder octamere Lücke führte nicht zu Amplifikaten der erwarteten Länge, stattdessen entsprach deren Länge einer direkten Ligation flankierender Oligonukleotide. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Anwesenheit beider flankierender Oligonukleotide, die die Primerregionen tragen, eine Ligation von mehr als einem kurzen ssDNA-Fragment zwischen diese gegenüber einer direkten Ligation benachteiligt ist und zu einer präferenziellen Amplifikation der direkt aneinander ligierten flankierenden Oligomere führt.

Eine Konsequenz hieraus bestand in der Benutzung von lediglich einem flankierenden Oligonukleotid, das an der PNA hybridisierte und an das enzymatisch ssDNA Fragmente ligiert wurden, was einer Elongation eines Primers in 5'-3'-Richtung gleichkam und mit der Funktion einer Polymerase verglichen werden kann. Die Elongation setzte sich dabei bis zum Ende der PNA und möglicherweise darüber hinaus fort. Daher wurden die zur Amplifikation der cDNA notwendigen Primerbindungsstellen 5'-seitig in einem Überhang des Startoligonukleotides vorgesehen. 3'-seitig konnte eine Hybridisierungsstelle für Primer entweder mit einem zu ligierenden terminalen Oligonukleotid angefügt werden (Abbildung 4.68 auf Seite 127), oder die aufgebaute PNA-komplementäre DNA selbst fungierte als Primerbindungsstelle (Abbildung 4.70 auf Seite 129). Die Ligation eines terminalen Oligonukleotides nach der Elongation des Start-Oligomers an der PNA verlief jedoch nicht

erfolgreich, da auch hier stets kürzere PCR-Vorlagen durch direkte Ligation entstanden und bevorzugt amplifiziert wurden, obwohl die Linker-DNA erst nach der Elongation zugegeben wurde (Seite 128). Analoge Experimente wurden unter Verwendung von tetramerer, trimerer und dimerer ssDNA durchgeführt, wobei stets zu kurze Amplifikate erhalten wurden. Die Verwendung von Abschnitten der generierten DNA selbst als Primerbindungsstelle war hingegen erfolgreich (Seite 130), da hier die erfolgreiche cDNA-Synthese an der PNA Voraussetzung für das Vorhandensein einer geeigneten PCR-Vorlage war. Dies führte zu einer hoch spezifischen Amplifikation der erzeugten DNA und zu Amplifikaten der erwarteten Länge und der korrekten Sequenz bei Verwendung von tetrameren und trimeren ssDNA-Fragmenten (Seite 128). Nachteilig hierbei war jedoch, dass 5–6 flankierende Nukleotide der PNA für die Amplifikation der komplementären DNA bekannt sein mussten. Der Einsatz von dimerer ssDNA war hingegen nicht erfolgreich, was auf eine Adenylierung des DNA-Fragmentes während der Ligationsreaktion zurückgeführt wurde [175]. Diese störte möglicherweise die Hybridisierung passender Fragmente an die PNA in einem Maße, welches die Anlagerung dimerer ssDNA aufgrund einer zu schwachen Wechselwirkung verhinderte, wohingegen diese bei trimerer DNA stark genug war.

Idealerweise bestünde die Synthese der komplementären DNA aus der Polymerisation einzelner Nukleotide. Obwohl die Elongation einer Nukleinsäure an einer PNA-Vorlage durch eine Polymerase beschrieben wurde [188], konnte dieses Verfahren bei der vorhandenen PNA und mit diversen Polymerasen nicht reproduziert und daher nicht für die cDNA-Synthese eingesetzt werden. Andere beschriebene Verfahren für den Transfer von Sequenzinformationen von artifiziellen Nukleinsäure-Analoga auf natürliche Nukleinsäuren basierten ausschließlich auf der chemischen Kopplung von Nukleotiden [189–194], die für die zu untersuchenden Abschnitte nicht hinreichend effizient war.

Das kleinste mögliche Akzeptor-Substrat für T4 RNA Ligase, das die 3'-OH Gruppe zur Verfügung stellt, muss eine Länge von mindestens drei Nukleotiden haben. T4 RNA Ligase katalysiert die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen diesem und einem phosphorylierten Donor-Substrat, welches ein Oligomer mit einer 5'-Phosphatgruppe oder ein 3',5'-Diphosphatnukleotid sein kann [195]. Daher bestand die Möglichkeit, die Größe der Fragmente für die enzymatische Synthese einer komplementären DNA oder RNA an einer PNA-Vorlage mit T4 RNA Ligase bis auf ein Nukleotid zu verringern, wenn ein „Start-Oligonukleotid“ mit 3'-OH Gruppe und einer Länge von mindestens drei Nukleotiden vorhanden war [196]. 3',5'-Diphosphatnukleotide schienen allerdings ungeeignet für diese Reaktion, da hier aus jedem Ligations-schritt ein phosphoryliertes 3'-Ende resultieren würde. Da dieses nicht als Substrat akzeptiert würde, müsste eine spezifische Dephosphorylierung des 3'-Endes vorgenommen werden, daher konnten herkömmliche Phosphatasen,

wie *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) oder *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) nicht verwendet werden, da diese auch 5'-Phosphatgruppen entfernten. Die kommerziell erhältliche T4 Polynukleotid Kinase weist eine spezifische Phosphatase-Aktivität für das 3'-Ende auf [197–198], würde aber gleichermaßen die Diphosphatnukleotide dephosphorylieren und diese als Substrat für die T4 RNA Ligase untauglich machen. Eine festphasenbasierte cDNA-Synthese analog zur Herstellung von Nukleinsäure-Oligomeren mit T4 RNA Ligase und der Möglichkeit, die Reagenzien sukzessive auszutauschen [199–201], wurde zunächst nicht in Betracht gezogen, da eine sequenzspezifische Synthese von DNA auf PNA-Vorlagen durch Verwendung einer Ligase eine hinreichend starke Wechselwirkung zwischen PNA und den Fragmenten voraussetzt, die bei singulären Nukleotiden nicht gegeben war. Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse bezüglich der Verwendung dimerer ssDNA, bei der potenziell eine Adenylierung während der Ligation eine ausreichend starke Hybridisierung an die PNA verhinderte, wurde der Einsatz von Nukleotiden für die cDNA-Synthese an einer PNA mit T4 RNA Ligase verworfen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren einen Transfer der Sequenzinformation von PNA auf DNA gestattet. Dabei scheinen trimere oder tetramere ssDNA-Fragmente optimal geeignet zu sein. Allerdings weisen sie im Gegensatz zu DNA-Dimeren den Nachteil auf, auch Vorlagen-unabhängig von T4 RNA Ligase untereinander verknüpft zu werden, was bei DNA-Dimeren nicht möglich ist, da das Akzeptor-Substrat mindestens eine Länge von drei Nukleotiden aufweisen muss. Die Methode erlaubt die sequenzspezifische Verlängerung eines Oligonukleotides an einer PNA-Vorlage. Damit wurde im Rahmen der Arbeit ein Abschnitt von 12 Nukleotiden an der PNA aufgebaut (Seite 129). Nach der Synthese kann die DNA amplifiziert und sequenziert werden, wodurch auf die Sequenz der PNA zurückgeschlossen werden kann. Durch die Amplifikation der PNA-Sequenzinformation war ein Auslesen dieser auch dann möglich, wenn die PNA in so geringen Mengen vorlag, dass eine Analyse durch klassische Verfahren wie Massenspektrometrie oder Spektroskopie nicht durchführbar ist. Da bislang sieben Nukleotide an der DNA für die Hybridisierung des Primers verwendet werden müssen, konnte lediglich die Sequenz von fünf Nukleotiden tatsächlich verifiziert werden, jedoch ist davon auszugehen, dass der gesamte Abschnitt der DNA die richtige Sequenz aufwies, da es ansonsten nicht zu einer Anlagerung des Primers gekommen wäre. Die Länge der generierbaren DNA scheint bei dieser Methode zunächst nicht limitiert zu sein.

Eine Möglichkeit, die Länge des zu untersuchenden Abschnittes zu erweitern, war die Ligation von terminalen Oligonukleotiden an die generierte DNA, an denen die Primer-Hybridisierung stattfinden konnte. Jedoch führte die

Diskussion

direkte Ligation jener Oligonukleotide, wie bereits oben erwähnt, zu einer PCR-Vorlage, die sowohl aufgrund der Länge, als auch aufgrund der Menge die Amplifikation der gewünschten DNA überlagerte (Seite 127). Der Einsatz von Restriktionsendonukleasen zum Abbau der unerwünschten PCR-Vorlagen blieb ohne Erfolg (Seite 132).

6 Ausblick

Analyse einer PNA-Sequenz

Die in dieser Arbeit etablierten Technologien erlauben die Ermittlung der Sequenz einer PNA. Hierbei sind Stoffmengen ausreichend, mit denen eine spektroskopische oder massenspektrometrische Analyse nicht durchführbar wäre. Die Stoffmenge der PNA, die den Amplifikationsansätzen nach der DNA-Synthese zugegeben wurde, betrug in den beschriebenen Versuchen 0,1 pmol. Die DNA-Synthese lief aller Wahrscheinlichkeit nach nicht vollständig ab, so dass die Menge komplementärer DNA noch unter der PNA-Menge lag, jedoch reichte sie für die Amplifikation durch PCR aus. Es ist zu erwarten, dass durch Optimierung der PCR und der Ligationsreaktion für die DNA-Synthese die notwendige PNA-Menge für die Analyse noch weiter zu senken ist. Zudem war die Spezifität der Reaktion hinreichend gut, so dass eine Aufreinigung der entstandenen DNA nicht notwendig war.

Optimierungsbedarf besteht zunächst in der Reduktion der Reaktionszeiten von mehreren Tagen, die für die Synthese der komplementären DNA an der PNA notwendig sind. Bei Verwendung längerer DNA-Fragmente war diese zwar kürzer, jedoch sind längere Fragmente aufgrund einer geringeren Präsenz der möglichen Sequenzen in einer Bibliothek nachteilig. Eine Möglichkeit zur Beschleunigung der Synthese liegt möglicherweise in der sukzessiven Änderung der Temperatur während der Reaktion. Dies würde zu einer höheren Dynamik der Reaktion und zur Dissoziation falsch hybridisierter DNA-Fragmente führen, die ansonsten die Ligation behindern. Hier wäre der Einsatz thermostabilerer einzelstrang-spezifischer Ligasen, wie einer homologen thermostabilen Variante der T4 RNA Ligase sinnvoll [202]. Neben den oben erwähnten Temperaturschwankungen würden diese möglicherweise sogar eine DNA-Synthese an der PNA im Sinne einer Ligase Amplifikations Reaktion (LAR; *ligation amplification reaction*) erlauben [203]. Hierbei werden ähnlich einer PCR die doppelsträngigen Ligationsprodukte wiederholt thermisch dissoziiert, wodurch die Vorlage für eine neue sequenz-spezifische Ligation zur Verfügung steht. Dadurch kommt es bereits bei der DNA-Synthese zu einer linearen Amplifikation der Sequenzinformation.

Die Anzahl der Ligasen, die ein PNA/DNA-Hybrid als Substrat akzeptieren ist mutmaßlich gering. Um geeignete Ligasen zu erhalten sind ebenfalls mutagene Ansätze zur Generierung entsprechender Enzyme denkbar. Kriterium für die Selektion könnte hierbei neben der Thermostabilität und der Eignung

für eine DNA-Ligation an PNA-Vorlagen auch eine Spezifität für PNA/DNA-Hybride sein, die eine Ligation nicht hybridisierter DNA-Fragmente unterbinden würde. Grundlage für eine gerichtete Mutagenese können bekannte einzelstrang- aber auch doppelstrang-spezifische Ligasen sein. Ebenfalls kann die Entwicklung von PNA-abhängigen DNA-Polymerasen erwogen werden. Geeignete Selektionsmethoden, die auf einer Wasser-in-Öl Emulsion basieren, sind bereits erfolgreich für eine Evolution von Polymerasen und Methyltransferasen eingesetzt worden [204–205].

Selektion von PNA-Aptameren

Zum Erhalt einer ausreichenden Diversität einer PNA-Bibliothek, mit der ein „*proof of principle*“ von PNA-Aptameren und einem Selektions-Verfahren möglich ist, sollte der randomisierte Abschnitt mindestens 10 bis 12 Monomere betragen. Daher besteht der wichtigste Schritt zunächst in der Ausdehnung dieses Bereiches, der für eine weiterführende Entwicklung der PNA-Aptamer-Technologie nach Möglichkeit noch weiter verlängert werden sollte.

Bei den im Rahmen der Arbeit entwickelten Methoden für eine PNA-Sequenz-Analyse werden flankierende Abschnitte von mindestens sechs Basen an der PNA benötigt, um Start-Oligonukleotide für die DNA-Synthese zu hybridisieren und um an der generierten DNA Hybridisierungsstellen für Primer zu erzeugen. Daher beträgt die Länge einer entsprechenden PNA-Bibliothek inklusive randomisiertem Abschnitt 22–24 Monomere. PNA dieser Länge sind gegebenenfalls noch eingeschränkt handhabbar, jedoch stellt die verhältnismäßig schlechte Löslichkeit längerer PNA ein Problem bei der Erhöhung der Diversität dar. Die Löslichkeit kann zwar durch entsprechende chemische Gruppen wie geladene Aminosäuren oder Nukleotide verbessert werden, jedoch können diese z.B. aufgrund ihrer Ladungen zu unerwünschten Effekten führen.

Alternative Ansätze bestehen daher in der Nutzung einer vollständig randomisierten PNA. Dies erfordert jedoch eine Amplifikation komplementärer DNA, die ohne bekannte Sequenzabschnitte der PNA durchführbar ist. Mögliche Lösungen liegen beispielsweise in der Ligation terminaler Oligonukleotide, die Hybridisierungsstellen für Primer enthalten. Versuche dieser Art führten bisher in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zum Erfolg, da die direkte Ligation dieser Oligomere problematisch war, da sie ebenfalls eine PCR-Vorlage generiert, die aufgrund der Kürze und der höheren Menge präferenziell amplifiziert wird.

Um eine evolutionäre Vorgehensweise bei der PNA-Selektion zu ermöglichen ist weiterhin die Vervielfältigung der PNA notwendig. Eine Technologie, die die sequenzabhängige Synthese von PNA anhand einer DNA-Vorlage ermöglicht ist bereits beschrieben [182]. Die Synthese besteht aus der chemischen Verknüpfung tetramerer PNA-Fragmente an einer DNA. Nach dem Transfer der Sequenz-Information von PNA auf DNA und deren Amplifikation ist es somit möglich, selektierte PNA-Moleküle neu zu synthetisieren und anzureichern, um sie in einer neuen Selektionsrunde einzusetzen. Das Verfahren ist bisher lediglich konzeptionell und muss zunächst für die Anforderungen einer PNA-Selektion optimiert und evaluiert werden.

Mit Methoden zur Sequenzierung und Vervielfältigung von PNA und einer effizienten Trennung von PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexen stehen alle Teiltechnologien für eine PNA-Selektion mittels evolutionärer Verfahren zur Verfügung. Diese werden zunächst in einem Modellsystem mit einem stabilen Zielmolekül für eine Selektion eingesetzt, um die Eignung von PNA als Liganden zu prüfen.

7 Zusammenfassung

Der Bedarf spezifischer und hoch-affiner Liganden für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz steigt zunehmend. Neben der Generierung von Antikörpern durch Immunisierung stehen mittlerweile *in vitro*-Technologien zur Verfügung, die die Herstellung von Liganden für nahezu alle denkbaren Zielmoleküle erlauben. Diese Verfahren basieren auf Molekül-Bibliotheken und bedienen sich evolutionärer Selektionsmethoden (z.B. *Phage-Display*, *Ribosome-Display* oder SELEX), um Moleküle mit den benötigten Eigenschaften zu isolieren. Bei den hierbei erhaltenen Molekülen handelt es sich jedoch ausschließlich um Biopolymere, wie Peptide, Proteine oder Nucleinsäuren, da bei Anwendung evolutionärer Selektionsmethoden eine Replikation der Komponenten unerlässlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Technologien entwickelt, die den Einsatz von Peptid Nucleinsäuren (PNA) in einem Selektionsprozess möglich machen, der an das etablierte SELEX-Verfahren zur Herstellung von Nucleinsäure-Aptameren angelehnt ist. Peptid Nucleinsäuren sind eine Nucleinsäure-analoge Verbindung, bei der das Ribose-Phosphodiester-Rückgrat durch einen Peptidstrang bestehend aus N-(2-Aminoethyl)glycin-Untereinheiten ausgetauscht ist. Dieser trägt die aus DNA bekannten Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin und versetzt PNA in die Lage, an DNA und RNA zu hybridisieren. Durch die artifizielle Struktur sind weitere Eigenschaften, wie eine erhöhte chemischen Stabilität und eine inhärente Resistenz gegenüber Nucleasen gegeben, was PNA auch für die Verwendung als spezifische Liganden interessant macht.

In einem Modellsystem konnte eine hoch effiziente Trennung von PNA und PNA/Zielmolekül-Komplexen auf der Basis von kapillarelektrophoretischen Verfahren etabliert werden. Hierbei wurde Sodiumdodecylsulfat (SDS) in Konzentration von $< 0,6$ mM als Ladungsvermittler eingesetzt und führte zu einer ausschließlichen Migration des verwendeten Proteins, während PNA aufgrund geringer Wechselwirkungen mit SDS in einem elektrischen Feld keine Wanderung zeigte. In den genutzten Konzentrationsbereichen führte SDS zudem nicht zu einer signifikanten Denaturierung des verwendeten Proteins. Damit steht eine effiziente Trennungsmethode von nicht bindenden PNA-Molekülen und PNA/Zielmolekül-Komplexen zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin Verfahren für die Sequenzierung kleiner Mengen unbekannter PNA entwickelt und evaluiert. Diese basieren auf dem Transfer der PNA-Sequenzinformation auf DNA, die anschließend

mittels PCR amplifiziert und sequenziert werden konnte, um so auf die PNA-Sequenz zurückzuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung einer PNA an komplementäre ssDNA aus einer entsprechenden Bibliothek und die anschließende Isolierung der Hybride nicht praktikabel war, da der Hintergrund bestehend aus nicht komplementären Bibliotheks-Komponenten auch durch die Kombination diverser Trennungs- und enzymatischer Abbau-Methoden nicht hinreichend gesenkt werden konnte.

Alternativ wurden daher Methoden für die Synthese PNA-komplementärer DNA entwickelt. Mittels chemischer Methoden konnte eine Verknüpfung hybridisierter DNA-Fragmenten auf einer PNA etabliert werden, jedoch war diese aufgrund zu geringer Effizienz für eine PNA-Sequenzierung nicht einsetzbar.

Durch enzymatische PNA-gerichtete Verknüpfung randomisierter DNA-Fragmente mit einer Länge von drei bis sechs Nukleotiden konnte eine PNA-komplementäre DNA synthetisiert und nachfolgend amplifiziert und sequenziert werden. Damit steht eine neue und effiziente Technologie für den Transfer der PNA-Sequenzinformation auf DNA zur Verfügung. Diese erlaubt eine Ermittlung der PNA-Sequenz bereits aus extrem geringen Mengen.

Dieser Transfer der Sequenz-Information von PNA auf DNA und bereits bekannte Methoden für die Synthese von PNA anhand einer DNA-Vorlage erlauben die Sequenzierung und die Vervielfältigung von PNA. In Kombination mit der entwickelten Trennungsmethode stehen die Basiskomponenten für eine Selektion von PNA-Aptameren mittels evolutionärer Verfahren zur Verfügung.

8 Summary

The demand for ligands with high specificity and high affinity for use in diagnostic or therapeutic applications is growing increasing rapidly. Today the generation of antibodies by immunization is complemented by technologies for *in vitro*-evolution that are capable of generating ligands for nearly every target-molecule. These methods base on combinatorial libraries which are screened by evolutionary processes like phage-display, ribosome-display or SELEX to obtain molecules with desired properties. These libraries so far consist exclusively of natural biopolymers, like peptides, proteins or nucleic acids, because evolutionary selection-processes require a replication of library-components.

Within this study technologies have been developed that permit the application of Peptide Nucleic Acids (PNA) in a selection-process similar to the SELEX-process used for generation of nucleic acid aptamers. PNA represent a nucleic acid analog in which the ribose-phosphodiester backbone is replaced by a peptide strand consisting of N-(2-Aminoethyl)glycine-subunits that each carry one of the four nucleobases adenine, cytosine, guanine and thymine. Therefore PNA is able to hybridize to natural nucleic acids. Due to the artificial structure PNA possess additional properties like enhanced chemical stability and an intrinsic resistance against nucleases which makes this compound highly interesting for the use as ligands.

A high efficient separation method for PNA and PNA/target-molecule complexes could be evaluated in a model system using capillary electrophoresis. Crucial factor in the separation-process is the ionic detergent sodium-dodecylsulfate (SDS) which has been added in concentrations up to 0.6 mM to the separation-buffer. The interaction with proteinic compounds causes an exclusive migration of proteins in the electrophoretic system while no significant denaturation of the used protein could be observed at this SDS-concentration. Because of electrical neutrality and obviously no remarkable interaction with SDS, PNA did not show any migration at all.

Additionally different approaches for sequencing an unknown PNA have been developed and evaluated in the present work. These depend basically on the transfer of PNA-sequence information onto DNA that can be amplified and sequenced subsequently.

It could be shown that hybridization of PNA to a complementary ssDNA from a random library and isolation of PNA/DNA-hybrids was not feasible due to the insufficient reduction of the background consisting of non-complementary library-components using physical separation and/or enzymatic degradation.

Summary

Alternative methods for the generation of a PNA-complementary DNA have been tested. Although a template directed synthesis of a PNA-complementary DNA by linkage of hybridized DNA-fragments using chemical methods could be established it was not applicable for PNA-sequencing due to inadequate yields.

A PNA-directed enzymatic synthesis of DNA by ligation of randomized fragments with T4 RNA ligase provided means for a new and efficient technology for the transfer of PNA-sequence information onto a complementary DNA. This technology allows the sequence-determination of PNA present in small amounts.

The information-transfer from PNA to DNA taken together with published methods for the DNA-directed synthesis of PNA makes sequencing as well as amplification of PNA possible. Combined with a high efficient separation method for PNA and PNA/target-molecule complexes all basic components which are necessary for the selection of PNA-aptamers are now available.

Literatur

- [1] Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U. und Wilson, I. A. (1992) Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science*, **255**(5047), 959-65.
- [2] Xu, W. und Ellington, A. D. (1996) Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**(15), 7475-80.
- [3] Pisabarro, M. T. und Serrano, L. (1996) Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain. *Biochemistry*, **35**(33), 10634-40.
- [4] Thorpe, D. S. (2000) Forecasting roles of combinatorial chemistry in the age of genomically derived drug discovery targets. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **3**(5), 421-36.
- [5] Darwin, C., *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.* (London, 1859).
- [6] Darwin, C., *The variation of animals and plants under domestication.* (London, 1868).
- [7] Darwin, C., *The descent of man and selection in relation to sex.* (London, 1871).
- [8] Burke, J. M. und Berzal-Herranz, A. (1993) In vitro selection and evolution of RNA: applications for catalytic RNA, molecular recognition, and drug discovery. *FASEB J.*, **7**(1), 106-12.
- [9] Conrad, U. und Scheller, J. (2005) Considerations on antibody-phage display methodology. *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.*, **8**(2), 117-26.
- [10] Bartel, D. P. und Szostak, J. W. (1993) Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science*, **261**(5127), 1411-8.
- [11] Vartanian, J., Henry, M. und Wain-Hobson, S. (1996) Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res.*, **24**(14), 2627-31.

- [12] Cadwell, R. und Joyce, G. (1994) Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.*, **3**(6), 136-40.
- [13] Nieuwlandt, D., Wecker, M. und Gold, L. (1995) In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*, **34**(16), 5651-9.
- [14] Bittker, J., Le, B. und Liu, D. (2002) Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nat. Biotechnol.*, **20**(10), 1024-9.
- [15] Anthony-Cahill, S. J. und Magliery, T. J. (2002) Expanding the natural repertoire of protein structure and function. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **3**(4), 299-315.
- [16] Stemmer, W. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, **370**(6488), 389-91.
- [17] Stemmer, W. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**(22), 10747-51.
- [18] Dolle, R. E. (2003) Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 2002. *J. Comb. Chem.*, **5**(6), 693-753.
- [19] Ohlmeyer, M. H., Swanson, R. N., Dillard, L. W., Reader, J. C., Asouline, G., Kobayashi, R., Wigler, M. und Still, W. C. (1993) Complex synthetic chemical libraries indexed with molecular tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**(23), 10922-6.
- [20] Ellman, J. A. (2000) Combinatorial methods to engineer small molecules for functional genomics. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 183-204..
- [21] DeWitt, S. H. und Czarnik, A. W. (1995) Automated synthesis and combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**(6), 640-5.
- [22] Martin, E. J., Blaney, J. M., Siani, M. A., Spellmeyer, D. C., Wong, A. K. und Moos, W. H. (1995) Measuring diversity: experimental design of combinatorial libraries for drug discovery. *J. Med. Chem.*, **38**(9), 1431-6.
- [23] Geysen, H. M., Rodda, S. J. und Mason, T. J. (1986) A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.*, **23**(7), 709-15.

- [24] Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**(4705), 1315-7.
- [25] Collins, J. (1997) Phage Display. *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity*, **1**, 210-62.
- [26] Hanes, J. und Plückthun, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(10), 4937-42.
- [27] Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R. und Dower, W. J. (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**(19), 9022-6.
- [28] Roberts, R. W. und Szostak, J. W. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**(23), 12297-302.
- [29] Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y. und Yanagawa, H. (1997) In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett.*, **414**(2), 405-8.
- [30] Leontis, N., Stombaugh, J. und Westhof, E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.*, **30**(16), 3497-531.
- [31] Eaton, B. E. und Pieken, W. A. (1995) Ribonucleosides and RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 837-63.
- [32] Jiang, F., Kumar, R. A., Jones, R. A. und Patel, D. J. (1996) Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex. *Nature*, **382**(6587), 183-6.
- [33] Woese, C. R., Winker, S. und Gutell, R. R. (1990) Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**(21), 8467-71.
- [34] Tuerk, C. und Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**(4968), 505-10.

- [35] Ellington, A. D. und Szostak, J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**(6287), 818-22.
- [36] Jayasena, S. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, **45**(9), 1628-50.
- [37] Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. und Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**(5152), 1425-9.
- [38] Jellinek, D., Lynott, C. K., Rifkin, D. B. und Janjic, N. (1993) High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**(23), 11227-31.
- [39] Famulok, M. (1994) Molecular recognition of amino acids by RNA-aptamers: An L-citrulline binding RNA motif and its evolution into an l-arginine binder *J. Am. Chem. Soc.*, **116**(5), 1698-706.
- [40] Majerfeld, I. und Yarus, M. (1994) An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe. *Nat. Struct. Biol.*, **1**(5), 287-92.
- [41] Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feistner, B. und Jayasena, S. D. (1996) High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acids Res.*, **24**(17), 3407-14.
- [42] Williams, K. P., Liu, X. H., Schumacher, T. N., Lin, H. Y., Ausiello, D. A., Kim, P. S. und Bartel, D. P. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**(21), 11285-90.
- [43] Lato, S. M., Boles, A. R. und Ellington, A. D. (1995) In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem. Biol.*, **2**(5), 291-303.
- [44] Tuerk, C., MacDougall, S. und Gold, L. (1992) RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus Type 1 reverse transcriptase *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**(15), 6988-92.
- [45] Pan, W., Craven, R. C., Qiu, Q., Wilson, C. B., Wills, J. W., Golovine, S. und Wang, J. F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**(25), 11509-13.

- [46] Wang, J., Jiang, H. und Liu, F. (2000) In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *RNA*, **6**(4), 571-83.
- [47] Travascio, P., Li, Y. und Sen, D. (1998) DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex. *Chem Biol*, **5**(9), 505-17.
- [48] Jellinek, D., Green, L. S., Bell, C., Lynott, C. K., Gill, N., Vargeese, C., Kirschenheuter, G., McGee, D. P., Abesinghe, P. und Pieken, W. A. (1995) Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, **34**(36), 11363-72.
- [49] Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. und Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with submicromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.*, **24**(6), 1029-36.
- [50] Sassanfar, M. und Szostak, J. W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature*, **364**(6437), 550-3.
- [51] Gold, L. (1995) Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J. Biol. Chem.*, **270**(23), 13581-4.
- [52] Yan, A. C., Bell, K. M., Breeden, M. M. und Ellington, A. D. (2005) Aptamers: prospects in therapeutics and biomedicine. *Front. Biosci.*, **10**, 1802-27.
- [53] Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B. und de Francis, V. (2002) Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett.*, **528**(1-3), 12-6.
- [54] Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K. und Bendele, R. A. (1999) Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology*, **42**(1-3), 219-30.
- [55] Di Giusto, D. und King, G. (2004) Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J. Biol. Chem.*, **279**(45), 46483-9.
- [56] Pestourie, C., Tavitian, B. und Duconge, F. (2005) Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie*, **87**(9-10), 921-30.

- [57] Zhang, Z., Blank, M. und Schluesener, H. J. (2004) Nucleic acid aptamers in human viral disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **52**(5), 307-15.
- [58] Tucker, C. E., Chen, L. S., Judkins, M. B., Farmer, J. A., Gill, S. C. und Drolet, D. W. (1999) Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **732**(1), 203-12.
- [59] Mendonsa, S. und Bowser, M. (2004) In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(1), 20-1.
- [60] Mendonsa, S. und Bowser, M. (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **76**(18), 5387-92.
- [61] Smith, J. und Anslyn, E. V. (1997) In vitro selection without intervening amplification *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **36**(17), 1879-81.
- [62] Smith, J. und Anslyn, E. (1997) Eine Methode zur In-vitro-Selektion ohne eingeschobene Amplifikationsschritte *Angew. Chem.*, **109**(17), 1956-58.
- [63] Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C. und Jayasena, S. D. (1994) Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res.*, **22**(24), 5229-34.
- [64] Micklefield, J. (2001) Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.*, **8**(10), 1157-79.
- [65] Stein, C., Subasinghe, C., Shinozuka, K. und Cohen, J. (1988) Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **16**(8), 3209-21.
- [66] Chowrira, B. und Burke, J. (1992) Extensive phosphorothioate substitution yields highly active and nuclease-resistant hairpin ribozymes. *Nucleic Acids Res.*, **20**(11), 2835-40.
- [67] Schreiber, G., Koch, E. und Neubert, W. (1985) Selective protection of in vitro synthesized cDNA against nucleases by incorporation of phosphorothioate-analogues. *Nucleic Acids Res.*, **13**(21), 7663-72.

- [68] Agrawal, S. (1996) Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotechnol.*, **14**(10), 376-87.
- [69] King, D., Ventura, D., Brasier, A. und Gorenstein, D. (1998) Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers. *Biochemistry*, **37**(47), 16489-93.
- [70] Hyrup, B., Richert, C., Schulte-Herbruggen, T., Benner, S. A. und Egli, M. (1995) X-ray crystal structure of a dimethylene sulfone-bridged ribonucleotide dimer in a single-stranded state. *Nucleic Acids Res.*, **23**(13), 2427-33.
- [71] Miller, P. S., Yano, J., Yano, E., Carroll, C., Jayaraman, K. und Ts'o, P. O. (1979) Nonionic nucleic acid analogues. synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry*, **18**(23), 5134-43.
- [72] Roughton, A. L., Portmann, S., Benner, S. A. und Egli, M. (1995) Crystal structure of a dimethylene sulfone-linked ribodinucleotide analog. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**(27), 7249-50.
- [73] Hobbs, J., Sternbach, H., Sprinzl, M. und Eckstein, F. (1973) Polynucleotides containing 2'-amino-2'-deoxyribose and 2'-azido-2'-deoxyribose. *Biochemistry*, **12**(25), 5138-45.
- [74] Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H. und Eckstein, F. (1991) Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science*, **253**(5017), 314-7.
- [75] Ito, Y. (1997) Modified nucleic acids for in vitro selection. *Nucleic Acids Symp Ser*, 259-60..
- [76] Heidenreich, O. und Eckstein, F. (1992) Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*, **267**(3), 1904-9.
- [77] Petersen, M. und Wengel, J. (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.*, **21**(2), 74-81.
- [78] Jepsen, J. S., Sorensen, M. D. und Wengel, J. (2004) Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology. *Oligonucleotides*, **14**(2), 130-46.

- [79] Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A. und Wengel, J. (1998) LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.*, **4**, 455-6.
- [80] Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., , und Wengel, J. (1998) LNA (locked nucleic acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition, *Tetrahedron*, **54**, 3607-3630.
- [81] Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L. und Magnani, M. (2002) Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **30**(11), 2435-43.
- [82] Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A. und Furste, J. P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol*, **14**(9), 1112-5.
- [83] Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V. A. und Furste, J. P. (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol*, **14**(9), 1116-9.
- [84] Wlotzka, B., Leva, S., Eschgfaller, B., Burmeister, J., Kleinjung, F., Kaduk, C., Muhn, P., Hess-Stumpp, H. und Klussmann, S. (2002) In vivo properties of an anti-GnRH spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**(13), 8898-902.
- [85] Lescrinier, E., Esnouf, R., Schraml, J., Busson, R., Heus, H., Hilbers, C. und Herdewijn, P. (2000) Solution structure of a HNA-RNA hybrid. *Chem. Biol.*, **7**(9), 719-31.
- [86] Joyce, G. F., Schwartz, A. W., Miller, S. L. und Orgel, L. E. (1987) The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **84**(13), 4398-402.
- [87] Schneider, K. C. und Benner, S. A. (1990) Oligonucleotides containing flexible nucleoside analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**(1), 453-5.
- [88] Summerton, J. und Weller, D. (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7**(3), 187-95.

- [89] Summerton, J. (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNaseH-independent structural type. *Biochim Biophys. Acta*, **1489**(1), 141-58.
- [90] Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. und Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**(5037), 1497-500.
- [91] Hyrup, B. und Nielsen, P. E. (1996) Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg. Med. Chem.*, **4**(1), 5-23.
- [92] Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. und Berg, R. (1992) Peptide nucleic acids (pna). oligonucleotides with an achiral peptide backbone *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1895-97.
- [93] Datta, B. und Armitage, B. (2001) Hybridization of PNA to structured DNA targets: quadruplex invasion and the overhang effect. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**(39), 9612-9.
- [94] Demidov, V., Protozanova, E., Izvol'sky, K., Price, C., Nielsen, P. und Frank-Kamenetskii, M. (2002) Kinetics and mechanism of the DNA double helix invasion by pseudocomplementary peptide nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**(9), 5953-8.
- [95] Demidov, V. V. und Frank-Kamenetskii, M. D. (2004) Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **29**(2), 62-71.
- [96] Soomets, U., Hallbrink, M. und Langel, U. (1999) Antisense properties of peptide nucleic acids. *Front. Biosci.*, **4**, D782-6.
- [97] Almarsson, O. und Bruice, T. C. (1993) Peptide nucleic acid (PNA) conformation and polymorphism in PNA-DNA and PNA-RNA hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**(20), 9542-6.
- [98] Orum, H., Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R., Buchardt, O. und Stanley, C. (1993) Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res.*, **21**(23), 5332-6.
- [99] Chandler, D., Stults, J., Cebula, S., Schuck, B., Weaver, D., Anderson, K., Egholm, M. und Brockman, F. (2000) Affinity purification of DNA and RNA from environmental samples with peptide nucleic acid clamps. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(8), 3438-45.

- [100] Ren, B., Zhou, J. und Komiyama, M. (2004) Straightforward detection of SNPs in double-stranded DNA by using exonuclease III/nuclease S1/PNA system. *Nucleic Acids Res.*, **32**(4), e42.
- [101] Jacob, A., Brandt, O., Stephan, A. und Hoheisel, J. (2004) Peptide nucleic acid microarrays. *Methods Mol. Biol.*, **283**, 283-93.
- [102] Lansdorp, P., Verwoerd, N., van de Rijke, F., Dragowska, V., Little, M., Dirks, R., Raap, A. und Tanke, H. (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, **5**(5), 685-91.
- [103] Seitz, O. (2000) Festphasensynthese doppelt markierter Peptidnucleinsäuren als Sonden für die Echtzeitdetektion der Hybridisierung. *Angew. Chem.*, **112**(18), 3389-92.
- [104] Ortiz, E., Estrada, G. und Lizardi, P. (1998) PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. *Mol. Cell. Probes.*, **12**(4), 219-26.
- [105] Ross, P., Lee, K. und Belgrader, P. (1997) Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry *Anal. Chem.*, **69**(20), 4197-4202.
- [106] Dean, D. (2000) Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **44**(2-3), 81-95.
- [107] Farese-Di Giorgio, A., Pairot, S., Patino, N., Condom, R., Di Giorgio, C., Aumelas, A., Aubertin, A. und Guedj, R. (1999) Synthesis of a new class of HIV-1 inhibitors. *Nucleosides Nucleotides*, **18**(2), 263-75.
- [108] Ray, A. und Norden, B. (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.*, **14**(9), 1041-60.
- [109] Demidov, V., Frank-Kamenetskii, M., Egholm, M., Buchardt, O. und Nielsen, P. (1993) Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res.*, **21**(9), 2103-7.
- [110] Zelder, F., Mokhir, A. und Kramer, R. (2003) Sequence selective hydrolysis of linear DNA using conjugates of Zr(IV) complexes and peptide nucleic acids. *Inorg. Chem.*, **42**(26), 8618-20.

- [111] Chakrabarti, M. und Schwarz, F. (1999) Thermal stability of PNA/DNA and DNA/DNA duplexes by differential scanning calorimetry. *Nucleic Acids Res.*, **27**(24), 4801-6.
- [112] Jensen, K. K., Orum, H., Nielsen, P. E. und Norden, B. (1997) Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry*, **36**(16), 5072-7.
- [113] Wittung, P., Nielsen, P. E., Buchardt, O., Egholm, M. und Norden, B. (1994) DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature*, **368**(6471), 561-3.
- [114] Larsen, H., Bentin, T. und Nielsen, P. (1999) Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**(1), 159-66.
- [115] Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S., Driver, D., Berg, R., Kim, S., Norden, B. und Nielsen, P. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, **365**(6446), 566-8.
- [116] Ratilainen, T., Holmen, A., Tuite, E., Haaima, G., Christensen, L., Nielsen, P. und Norden, B. (1998) Hybridization of peptide nucleic acid. *Biochemistry*, **37**(35), 12331-42.
- [117] Uhlmann, E., Peyman, A., Breipohl, G. und Will, D. (1998) PNAs: synthetische Polyamidnucleinsäuren mit aussergewöhnlichen Bindungseigenschaften. *Angew. Chem.*, **110**(20), 2954-83.
- [118] Kristensen, E. (2002) In vitro and in vivo studies on the pharmacokinetics and metabolism of PNA constructs in rodents. *Methods Mol Biol*, **208**, 259-69.
- [119] McMahon, B., Mays, D., Lipsky, J., Stewart, J., Fauq, A. und Richelson, E. (2002) Pharmacokinetics and tissue distribution of a peptide nucleic acid after intravenous administration. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**(2), 65-70.

- [120] Hamzavi, R., Dolle, F., Tavitian, B., Dahl, O. und Nielsen, P. (2003) Modulation of the pharmacokinetic properties of PNA: preparation of galactosyl, mannosyl, fucosyl, N-acetylgalactosaminyl, and N-acetylglucosaminyl derivatives of aminoethylglycine peptide nucleic acid monomers and their incorporation into PNA oligomers. *Bioconjug. Chem.*, **14**(5), 941-54.
- [121] Merrifield, B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.
- [122] Dueholm, K., Egholm, M., Behrens, C., Christensen, L., Hansen, H., Vulpius, T., Petersen, K., Berg, R., Nielsen, P. und Buchardt, O. (1994) Synthesis of peptide nucleic acid monomers containing the four natural nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine and Guanine and their oligomerization *J. Org. Chem.*, **59**, 5767-73.
- [123] Christensen, L. *et al.* (1995) Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J. Pept. Sci.*, **1**(3), 175-83.
- [124] Nielsen, P. E. und Egholm, M., *Peptide Nucleic Acids: Protocols and applications..* (Horizon Scientific Press, Norfolk; England, 1999).
- [125] Nielsen, P. E. (2000) Antisense peptide nucleic acids. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**(3), 282-7.
- [126] Rasmussen, H., Kastrop, J. S., Nielsen, J. N., Nielsen, J. M. und Nielsen, P. E. (1997) Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**(2), 98-101.
- [127] Haaima, G., Rasmussen, H., Schmidt, G., Jensen, D. K., Kastrop, J. S., Stafshede, P. W., Norden, B., Buckhardt, O. und Nielsen, P. E. (1999) Peptide nucleic acids (PNA) derived from N-(N-methylaminoethyl)glycine. Synthesis, hybridization and structural properties. *New J. Chem.*, **23**, 833-40.
- [128] Eldrup, A. B., Nielsen, B. B., Haaima, G., Rasmussen, H., Kastrop, J. S., Christensen, C. und Nielsen, P. E. (2001) 1,8-Naphthyridin-2(1H)-ones - Novel bicyclic and tricyclic analogues of thymine in peptide nucleic acids (PNAs) *Eur. J. Org. Chem.*, 1781-90.

- [129] Rasmussen, H., Liljefors, T., Petersson, B., Nielsen, P. E., Liljefors, T. und Kastrop, J. S. (2004) The influence of a chiral amino acid on the helical handedness of PNA in solution and in crystals. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **21**(4), 495-502.
- [130] Menchise, V., De Simone, G., Tedeschi, T., Corradini, R., Sforza, S., Marchelli, R., Capasso, D., Saviano, M. und Pedone, C. (2003) Insights into peptide nucleic acid (pna) structural features: the crystal structure of a d-lysine-based chiral pna-dna duplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(21), 12021-6.
- [131] Brown, S. C., Thomson, S. A., Veal, J. M. und Davis, D. G. (1994) NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science*, **265**(5173), 777-80.
- [132] Eriksson, M. und Nielsen, P. E. (1996) Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Nat. Struct. Biol.*, **3**(5), 410-3.
- [133] Betts, L., Josey, J. A., Veal, J. M. und Jordan, S. R. (1995) A nucleic acid triple helix formed by a peptide nucleic acid-DNA complex. *Science*, **270**(5243), 1838-41.
- [134] Wittung, P., Nielsen, P. und Norden, B. (1997) Observation of a PNA-PNA-PNA Triplex *J. Am. Chem. Soc.*, **119**(13).
- [135] Armitage, B., Ly, D., Koch, T., Frydenlund, H., Orum, H. und Schuster, G. B. (1998) Hairpin-forming peptide nucleic acid oligomers. *Biochemistry*, **37**(26), 9417-25.
- [136] Krishnan-Ghosh, Y., Stephens, E. und Balasubramanian, S. (2004) A PNA4 quadruplex. *J Am Chem Soc*, **126**(19), 5944-5.
- [137] Petersson, B., Nielsen, B. B., Rasmussen, H., Larsen, I. K., Gajhede, M., Nielsen, P. E. und Kastrop, J. S. (2005) Crystal structure of a partly self-complementary peptide nucleic acid (PNA) oligomer showing a duplex-triplex network. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(5), 1424-30.
- [138] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D. (1981) Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries *Anal. Chem.*, 1298-302.
- [139] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D. (1983) Capillary zone electrophoresis *Science*, 266-72.

- [140] Grossmann, P. D. und Colburn, J. C., *Capillary Electrophoresis, Theory and Practise*. (Academic Press, 1992).
- [141] Jandik, P. und Bon, G., *Capillary elektrophoresis of small molecules and ions*. (Verlag Chemie, 1993).
- [142] Kortüm, G., *Lehrbuch der Elektrochemie*. (Verlag Chemie, 1972).
- [143] Chiari, M. und Nesi, M. (1993) Movement of DNA fragments during capillary zone electrophoresis in liquid polyacrylamid. *Journal of Chromatography*, **652**, 31-39.
- [144] Zhao, C., Xu, G., Xianzhe, S., Ma, J., Zhang, Y., Lv, S., weng, Q. und Yang, Q. (2004) Fluorescent-based single-strand conformation polymorphism/heteroduplex capillary electrophoretic mutation analysis of the P53 gene *Analytical Sciences*, **20**, 1001-5.
- [145] Dolnik, V. *et al.* (1998) Wall coating for DNA sequencing and fragment analysis by capillary electrophoresis. *J. Microcolumn Sep.*, **10**(2), 175-84.
- [146] Schutzrecht US 6372353-B2 (2002-04-16) Karger, B. und Goetzinger, W.
- [147] Li, S. F. Y., *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*, volume 52 of *Journal of chromatography library*. (Elsevier Science Publishers, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1993).
- [148] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikama, K., Tsuchia, A. und Ando, T. (1984) Elektrokinetik separations with micellar solutions and open tubular capillaries. *Anal. Chem.*, **56**(111-3).
- [149] Terabe, S., Otsuka, K. und Ando, T. (1985) Elektrokinetik separations with micellar solution and open tubular capillary. *Anal. Chem.*, **57**(834-41).
- [150] Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual..* (Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- [151] Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-50.

- [152] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839), 487-91.
- [153] Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**(6), 1513-23.
- [154] Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**(2), 615-9.
- [155] Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**(7), 2172-5.
- [156] Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**(13), 6127-45.
- [157] Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**(12), 5463-7.
- [158] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-5.
- [159] Hillcoat, B., Nixon, P. und Blakley, R. (1967) Effect of substrate decomposition on the spectrophotometric assay of dihydrofolate reductase. *Anal. Biochem.*, **21**(2), 178-89.
- [160] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**(1), 76-85.
- [161] Williams, P. E., Marino, M. A., Del Rio, S. A., Turni, L. A. und Devaney, J. M. (1994) Analysis of DNA restriction fragments and polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, **680**(2), 525-40.

- [162] Zhu, M., Hansen, D. L., Burd, S. und Gannon, F. (1989) Factors affecting free zone electrophoresis and isoelectric focusing in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **480**, 311-9.
- [163] Butler, J. M., McCord, B. R., Jung, J. M., Wilson, M. R., Budowle, B. und Allen, R. O. (1994) Quantitation of polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis using laser fluorescence. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **658**(2), 271-80.
- [164] Ren, J. und Ueland, P. M. (1999) Temperature and pH effects on single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Hum. Mutat.*, **13**(6), 458-63.
- [165] Golovacheva, R. S., Loginova, L. G., Salikhov, T. A., Kolesnikov, A. A. und Zaitseva, G. N. (1975) [New species of thermophilic bacilli—*Bacillus thermocatenulatus* nov. sp] *Mikrobiologiya*, **44**(2), 265-8.
- [166] Gite, S., Reddy, G. und Shankar, V. (1992) Active-site characterization of S1 nuclease. I. Affinity purification and influence of amino-group modification. *Biochem. J.*, **285** (Pt 2), 489-94.
- [167] Gite, S., Reddy, G. und Shankar, V. (1992) Active-site characterization of S1 nuclease. II. Involvement of histidine in catalysis. *Biochem. J.*, **288** (Pt 2), 571-5.
- [168] Protozanova, E., Demidov, V., Nielsen, P. und Frank-Kamenetskii, M. (2003) Pseudocomplementary PNAs as selective modifiers of protein activity on duplex DNA: the case of type II restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **31**(14), 3929-35.
- [169] Protozanova, E., Demidov, V., Soldatenkov, V., Chasovskikh, S. und Frank-Kamenetskii, M. (2002) Tailoring the activity of restriction endonuclease P1eI by PNA-induced DNA looping. *EMBO Rep.*, **3**(10), 956-61.
- [170] Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R. und Buchardt, O. (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**(2), 197-200.
- [171] Kuhn, H., Hu, Y., Frank-Kamenetskii, M. und Demidov, V. (2003) Artificial site-specific DNA-nicking system based on common restriction enzyme assisted by PNA openers. *Biochemistry*, **42**(17), 4985-92.

- [172] Izvolsky, K., Demidov, V., Nielsen, P. und Frank-Kamenetskii, M. (2000) Sequence-specific protection of duplex DNA against restriction and methylation enzymes by pseudocomplementary PNAs. *Biochemistry*, **39**(35), 10908-13.
- [173] Dolinnaya, N., Sokolova, N., Gryaznova, O. und Shabarova, Z. (1988) Site-directed modification of DNA duplexes by chemical ligation. *Nucleic Acids Res.*, **16**(9), 3721-38.
- [174] Sokolova, N., Ashirbekova, D., Dolinnaya, N. und Shabarova, Z. (1988) Chemical reactions within DNA duplexes. Cyanogen bromide as an effective oligodeoxyribonucleotide coupling agent. *FEBS Lett.*, **232**(1), 153-5.
- [175] Hinton, D. M. und Gumport, R. I. (1979) The synthesis of oligodeoxyribonucleotides using RNA ligase. *Nucleic Acids Res.*, **7**(2), 453-64.
- [176] Peake, S. (1993) Monoclonal antibodies-immunotherapy for the critically ill. *Anaesth Intensive Care*, **21**(6), 739-51.
- [177] Kohler, G. und Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**(5517), 495-7.
- [178] Dolle, R. E. (2001) Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 2000. *J Comb. Chem.*, **3**(6), 477-517.
- [179] Famulok, M. und Mayer, G. (1999) Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **243**, 123-36.
- [180] Smirnov, I. und Shafer, R. (2000) Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability. *Biochemistry*, **39**(6), 1462-8.
- [181] Benner, S. A. *et al.* (1998) Redesigning nucleic acids. *Pure Appl. Chem.*, **70**(2), 263-6.
- [182] Rosenbaum, D. und Liu, D. (2003) Efficient and sequence-specific DNA-templated polymerization of peptide nucleic acid aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(46), 13924-5.
- [183] Pingoud, A. und Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, **29**(18), 3705-27.

- [184] Kanaya, E. und Yanagawa, H. (1986) Template-directed polymerization of oligoadenylates using cyanogen bromide. *Biochemistry*, **25**(23), 7423-30.
- [185] Selvasekaran, J. und Turnbull, K. (1999) Chemical ligation of oligodeoxyribonucleotides on circular DNA templates. *Nucleic Acids Res.*, **27**(2), 624-7.
- [186] Cherepanov, A. V. und de Vries, S. (2002) Dynamic mechanism of nick recognition by DNA ligase. *Eur. J. Biochem.*, **269**(24), 5993-9.
- [187] Doherty, A. J. und Suh, S. W. (2000) Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Res.*, **28**(21), 4051-8.
- [188] Misra, H., Pandey, P., Modak, M., Vinayak, R. und Pandey, V. (1998) Polyamide nucleic acid-DNA chimera lacking the phosphate backbone are novel primers for polymerase reaction catalyzed by DNA polymerases. *Biochemistry*, **37**(7), 1917-25.
- [189] Kozlov, I. A., Politis, P. K., Van Aerschot, A., Busson, R., Herdewijn, P. und Orgel, L. E. (1999) Nonenzymatic synthesis of RNA and DNA oligomers on hexitol nucleic acid templates: the importance of the A structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**(12), 2653-6.
- [190] Kozlov, I. A. und Orgel, L. E. (1999) Nonenzymatic oligomerization reactions on templates containing inosinic acid or diaminopurine nucleotide residues. *Helv. Chim. Acta.*, **82**(11), 1799-805.
- [191] Kozlov, I. A., De Bouvere, B., Van Aerschot, A., Herdewijn, P. und Orgel, L. E. (1999) Efficient transfer of information from hexitol nucleic acids to RNA during nonenzymatic oligomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**(25), 5856-9.
- [192] Kozlov, I. A., Politis, P. K., Pitsch, S., Herdewijn, P. und Orgel, L. E. (1999) A highly enantio-selective hexitol nucleic acid template for nonenzymatic oligoguanylate synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**(5), 1108-9.
- [193] Kozlov, I. A. und Orgel, L. E. (1999) Oligomerization of deoxyguanosine 5'-phosphoro-2-methylimidazole on a polycytidylate template. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **29**(6), 593-5.

- [194] Kozlov, I. A., Zielinski, M., Allart, B., Kerremans, L., Van Aer-schot, A., Busson, R., Herdewijn, P. und Orgel, L. E. (2000) Nonenzymatic template-directed reactions on altritol oligomers, preor-ganized analogues of oligonucleotides. *Chemistry*, **6**(1), 151-5.
- [195] Kaufmann, G., Klein, T. und Littauer, U. Z. (1974) T4 RNA ligase: substrate chain length requirements. *FEBS Lett*, **46**(1), 271-5.
- [196] Kikuchi, Y., Hishinuma, F. und Sakaguchi, K. (1978) Addition of mononucleotides to oligoribonucleotide acceptors with T4 RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **75**(3), 1270-3.
- [197] Richardson, C., *Bacteriophage T4 polynucleotide kinase* (Academic Press, San Diego, 1981), vol. 14 of *The Enzymes*, pp. 299-314.
- [198] Cameron, V., Soltis, D. und Uhlenbeck, O. C. (1978) Polynucleo-tide kinase from a T4 mutant which lacks the 3' phosphatase activity. *Nucleic Acids Res.*, **5**(3), 825-33.
- [199] England, T. E. und Uhlenbeck, O. C. (1978) Enzymatic oligoribo-nucleotide synthesis with T4 RNA ligase. *Biochemistry*, **17**(11), 2069-76.
- [200] Middleton, T., Herlihy, W. C., Schimmel, P. R. und Munro, H. N. (1985) Synthesis and purification of oligoribonucleotides using T4 RNA ligase and reverse-phase chromatography. *Anal. Biochem.*, **144**(1), 110-7.
- [201] Gumport, R. I. und Uhlenbeck, O. C. (1981) T4 RNA ligase as a nucleic acid synthesis and modification reagent. *Gene Amplif. Anal.*, **2**, 313-45.
- [202] Blondal, T., Hjorleifsdottir, S. H., Fridjonsson, O. F., Aevarsson, A., Skirnisdottir, S., Hermannsdottir, A. G., Hreggvidsson, G. O., Smith, A. V. und Kristjansson, J. K. (2003) Discovery and charac-terization of a thermostable bacteriophage RNA ligase homologous to T4 RNA ligase 1. *Nucleic Acids Res.*, **31**(24), 7247-54.
- [203] Wu, D. Y. und Wallace, R. B. (1989) The ligation amplification re-action (LAR)-amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics*, **4**(4), 560-9.

- [204] Ghadessy, F. J., Ramsay, N., Boudsocq, F., Loakes, D., Brown, A., Iwai, S., Vaisman, A., Woodgate, R. und Holliger, P. (2004) Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. *Nat. Biotechnol.*, **22**(6), 755-9.
- [205] Cohen, H. M., Tawfik, D. S. und Griffiths, A. D. (2004) Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization. *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**(1), 3-11.

Anhang

Informationen zu den Abbildungen

Abb. 4.1, Seite 64

Die mit dem Vektor pET26-DHFR-His transformierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in LB-Medium mit $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600}=1$ kultiviert und mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zellysate zur Reinigung der rekombinanten DHFR einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen. Dabei wurden unspezifisch gebundene Proteine mit 25 mM Imidazol von der Säule entfernt, bevor die DHFR mit 250 mM Imidazol eluiert wurde. Um restliche Verunreinigungen zu entfernen, wurde das gewünschte Protein anschließend in einer Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt.

Abb. 4.3, Seite 65

Transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in LB-Medium mit $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600}=1$ kultiviert und mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurde 3 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurden zur Kontrolle in Abständen von 1 h der Expressionskultur (+), sowie einem nicht induzierten Ansatz (-) Proben entnommen. Jeweils 100 μl der Zellsuspension wurden 5 min bei $16.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und thermisch aufgeschlossen.

Abb. 4.4, Seite 67

Für die Bestimmung der DHFR-Aktivität von koordinativ immobilisierter DHFR wurden 200 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 3 mg/ml 3 h bei RT in den Vertiefungen der Strips inkubiert. Anschließend wurde zwei mal mit 200 μl DHFR-Testpuffer gewaschen. Die Reaktionsmischung, die 66 μl DHFR-Testpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5), 100 μl ddH₂O und 14 μl NADPH-Lösung (100 μM) enthielten, wurden, in einer Küvette 5 min bei RT inkubiert, anschließend wurden 20 μl FH₂ (75 μM) in DHFR-Testpuffer zugegeben und unmittelbar danach die optische Dichte der Lösung bei 340 nm vermessen ($E_{t=0}$), wobei DHFR-Testpuffer:H₂O (1:1) als Referenzwert diente. Die Reaktionslösung wurde zügig aus der Küvette in die entsprechende Vertiefung der Strips überführt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Überführung der Lösung in die Küvette abgebrochen und es wurde wiederum die optische Dichte vermessen ($E_{t=30}$). Zur Berechnung

der Probenaktivität wurde zunächst die Differenz (ΔE) der Absorption zum Zeitpunkt $t=0$ min ($E_{t=0}$) und $t=30$ min ($E_{t=30}$) gebildet. Von diesen Werten wurde der entsprechende Wert einer Kontrolle abgezogen, die in einer Vertiefung ohne immobilisierter DHFR durchgeführt wurde.

Abb. 4.5, Seite 67

Die Reaktionsmischung, die 66 μl DHFR-Testpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5), 100 μl ddH₂O und 14 μl NADPH (100 μM) enthielten, wurden, in einer Küvette 5 min bei RT inkubiert, anschließend wurde 20 μl FH₂ (75 μM) in DHFR-Testpuffer zugegeben und unmittelbar danach die optische Dichte der Lösung bei 340 nm vermessen ($E_{t=0}$), wobei DHFR-Testpuffer:H₂O (1:1) als Referenzwert diente. Die Reaktionslösung wurde zügig aus der Küvette in das entsprechende Reaktionsgefäß überführt, das die sedimentierten Partikel enthielt. Diese wurden in der Reaktionslösung resuspendiert und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die Partikel wurden dann mit einem Permanentmagneten sedimentiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei 340 nm vermessen ($E_{t=30}$). Zur Berechnung der Probenaktivität wurde zunächst die Differenz (ΔE) der Absorption zum Zeitpunkt $t=0$ min ($E_{t=0}$) und $t=30$ min ($E_{t=30}$) gebildet. Von diesen Werten wurde der entsprechende Wert einer Kontrolle abgezogen, die ohne Partikel durchgeführt wurde.

Abb. 4.7, Seite 70

Die Flussrate betrug 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die mobilen Phasen waren 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH 7) und Acetonitril. Säule: *reverse phase*; C18; ID=1 mm; Länge=10 cm; Partikeldurchmesser=3 μm . Detektion: UV 254 nm.

Abb. 4.11, Seite 73

Die Kapillare mit einer effektiven Länge von 51 cm, einer Gesamtlänge von 70 cm und einem Innendurchmesser von 75 μm war mit Polyacrylamid belegt, was den Elektroosmotischen Fluss vollständig unterdrückte. Der Laufpuffer enthielt 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,3) und SDS in den Konzentrationen von 0,2 mM oder 0,6 mM. Bei der Trennung befand sich die Anode an der Detektorseite. Die angelegte Spannung betrug 430 V/cm. Die Temperatur der Kapillare betrug 28 °C. Die Detektion erfolgte mit einem Absorptionsdetektor bei 200 nm. Injektion: hydrodynamisch für 2 s.

Abb. 4.14, Seite 76

Die PCR-Reaktionen enthielten 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,2 μM je dNTP, 1 μM jedes Primers, sowie 2 Units Taq- bzw. 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase. Nach der Primärdenaturierung (95 °C, 6 min) wurden 30 Zyklen

(94 °C, 45 s; 38 °C, 1 min; 72 °C, 30 s) durchlaufen.

Abb. 4.15, Seite 77

Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 200 µl wurden mit 12 nmol (120 µl, 100 µM) DNA-Bibliothek (Pos2) inkubiert und mit 150 µl diverser Puffer und variierenden Wiederholungen gewaschen. Nach den Waschgängen wurden in den Gefäßen eine PCR mit einem Volumen von 50 µl durchgeführt (95 °C, 6 min Primärdenaturierung; 94 °C, 45 s; 38 °C, 1 min; 72 °C, 30 s, 30 Zyklen).

Abb. 4.17, Seite 79

Nach Inkubation der Streptavidin-Agarose in 30 µl Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 20 mM DTT) wurde die Lösung von der Matrix separiert und einer Gelfiltration (Sephadex G-25) unterzogen. Das Eluat wurde mit den nötigen Komponenten für eine PCR auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und 30 Amplifikationszyklen unterzogen (95 °C, 6 min Primärdenaturierung; 94 °C, 45 s; 38 °C, 1 min; 72 °C, 30 s).

Abb. 4.20, Seite 82

Die Flussrate betrug 1,3 ml/min. Die mobilen Phasen waren 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH 7) und Acetonitril. Säule: *reverse phase*; C4; ID=4,6 mm; Länge=25 cm; Partikeldurchmesser=5 µm (Vydac 241TP54). Detektion: UV 254 nm.

Abb. 4.21, Seite 83

Die Flussrate betrug 1,3 ml/min. Die mobilen Phasen waren 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH 7) und Acetonitril. Säule: *reverse phase*; C4; ID=4,6 mm; Länge=25 cm; Partikeldurchmesser=5 µm (Vydac 241TP54). Detektion: UV 254 nm. Die Trennung wurde mit einem Acetonitrilanteil von 13 % gestartet und bei 7,5 min auf 50 % erhöht.

Abb. 4.25, Seite 87

Die Hybridisierung der PNA an das Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev erfolgte durch eine langsame Abkühlung auf RT nach 5 min Erwärmung auf 94 °C. Erst nachfolgend wurden die zu den Primerregionen komplementären Oligonukleotide Pos3(3)rev und Pos4(3) zugegeben, die Ansätze 5 min auf 48 °C erwärmt und auf die Reaktionstemperatur abgekühlt. Die Inkubation erfolgte 15 h bei 20 °C mit 10 bzw. 20 Units Mungobohnen Nuklease.

Abb. 4.26, Seite 88

Die Ansätze wurden 5 min auf 48 °C erwärmt und langsam abgekühlt, bevor

die Nuklease zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte 15 h bei 20 °C. Die Degradierung wurde durch thermische Inaktivierung der Mungobohnen Nuklease für 20 min bei 70 °C abgebrochen und die Ansätze mittels einer Gelfiltration aufgereinigt. Die Eluate wurden mit den nötigen Komponenten für eine PCR auf 50 µl aufgefüllt und die enthaltene DNA in Standard PCR-Puffer amplifiziert (95 °C, 6 min Primärdenat., 94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s, 30 Zyklen).

Abb. 4.28, Seite 90

Vor Zugabe von 0,4 U S1 Nuklease wurden die Ansätze auf 46 °C erwärmt und langsam auf 20 °C gekühlt. Diese Temperatur lag über der Schmelztemperatur der Schutzoligonukleotide für die Primerregionen, jedoch weit unter der Schmelztemperatur der PNA/DNA-Hybridisierung. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA Lösung (0,5 M) und 10 min Erwärmung auf 70 °C abgebrochen. Nach einer Gelfiltration (Sephadex G-25) wurde das Eluat mit den nötigen Komponenten für eine PCR auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde in Standard PCR Puffer durchgeführt (95 °C, 6 min Primärdenat., 94 °C, 45 s; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s, 30 Zyklen).

Abb. 4.30, Seite 92

PCR-Programm: 95 °C, 6 min Primärdenaturierung, 94 °C, 1 min; 46 °C, 1 min; 72 °C, 30 s, 30 Zyklen

Abb. 4.31, Seite 93

Die Ansätze hatten ein Volumen von 50 µl und enthielten zudem 200 µM je dNTP, die Oligonukleotide Pos3 und Pos4 in der Konzentration von je 1 µM, 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase, 1 µg/ml BSA und 2 mM EDTA. Die Ansätze enthielten das Oligonukleotid Pos2(5) als Vorlage. PCR-Programm: 95 °C, 6 min Primärdenaturierung; 94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen.

Abb. 4.32, Seite 94

Die Verdauungsansätze hatten ein Volumen von 25 µl und enthielten 10⁵ Moleküle des Oligonukleotides Pos2(5)D2-1rev bzw. die entsprechenden PNA-Hybride, die Oligonukleotide Pos3(5)rev und Pos4(5) in Konzentrationen von je 0,8 µM und 0,4 U S1 Nuklease in 1x Puffer D. Der zweite Ansatz mit einem Volumen von 25 µl enthielt 400 µM je dNTP, die Oligonukleotide Pos3(5) und Pos4(5) in Konzentrationen von 2 µM, 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase, 2 µg/ml BSA und 4 mM EDTA in 1x Puffer 7. Der Verdauungsansatz wurde 15 min bei 20 °C inkubiert und vor der PCR in den zweiten Ansatz gegeben. PCR-Programm: Primärdenaturierung 95 °C, 6 min; 94 °C,

45 s; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen.

Abb. 4.34, Seite 96

Das obere Kompartiment hatte ein Volumen von 25 µl und enthielt 10⁵ Moleküle der Oligonukleotidbibliothek Pos2(5)D2-1rev bzw. die entsprechenden PNA-Hybride, die Oligonukleotide Pos3(5)rev und Pos4(5) in Konzentrationen von je 0,8 µM und 0,4 U S1 Nuklease in 1x Puffer D. Das untere Kompartiment, das durch 50 µl Heptadecan/Paraffinwachs (25:1 (v/w)) vom oberen getrennt war, hatte ebenfalls ein Volumen von 25 µl und enthielt 400 µM je dNTP, die Oligonukleotide Pos3(5) und Pos4(5) in Konzentrationen von 2 µM, 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase, 2 µg/ml BSA und 4 mM EDTA in 1x Puffer 7. Die Ansätze wurden 15 min bei 20 °C inkubiert und vor der PCR 4 min auf 30 °C erwärmt. Nach der Primärdenaturierung (95 °C, 6 min) wurden 30 Amplifikationszyklen (94 °C, 45 s; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s) durchgeführt.

Abb. 4.35, Seite 97

Das untere Kompartiment mit einem Volumen von 25 µl enthielt 400 µM je dNTP, 2 µM der Oligonukleotide Pos3(5) und Pos4(5), 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase, 2 µg/ml BSA, 4 mM EDTA in Puffer 7. Das obere Kompartiment mit einem Volumen von ebenfalls 25 µl enthielt 10⁸ Moleküle der Oligonukleotidbibliothek Pos2(5)D2-1rev, 0,8 µM der Oligonukleotide Pos3(5)rev und Pos4(5) und variierende Mengen S1 Nuklease in Puffer D und war durch 50 µl Heptadecan/Paraffinwachs (25:1 (v/w)) von der unteren Schicht getrennt. Die Ansätze wurden 15 min bei 20 °C inkubiert und vor der PCR 4 min auf 30 °C erwärmt. Nach der Primärdenaturierung (95 °C, 6 min) wurden 30 Amplifikationszyklen (94 °C, 45 s; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s) durchlaufen.

Abb. 4.37, Seite 99

Die 50 µl Ansätze enthielten die Oligonukleotide Pos2(XbaI)D2-1rev, Pos3 und Pos4(XbaI) jeweils in Konzentrationen von 1 µM in PCR-Puffer 3. Im mittleren Bereich der DNA wurde in verschiedenen Ansätzen entweder komplementäre PNA oder das Oligonukleotid D2-1 hybridisiert, die in äquimolaren Mengen vorlagen. Vor Zugabe von 5 Units XbaI wurden die Ansätze 2 min auf 94 °C erwärmt und über einen Zeitraum von 30 min abgekühlt. Die Inkubation erfolgte 15 h bei 37 °C.

Abb. 4.39, Seite 101

Die 50 µl Ansätze enthielten die Oligonukleotide Pos2(XbaI2)D2-1rev, Pos3 und Pos4(XbaI2) in Konzentrationen von je 1 µM, 0,2 µM je dNTP und gegebenenfalls 1 µM komplementäre PNA in PCR-Puffer 3. Die Ansätze wurden

2 min auf 94 °C erwärmt und über einen Zeitraum von 30 min abgekühlt.

Abb. 4.42, Seite 102

Die Ansätze enthielten die Oligonukleotide Pos2(3)D2-1rev, Pos3(3) und Pos4 in Konzentrationen von je 1 µM und 0,2 mM je dNTP. Zudem enthielt jeder Ansatz 0,4 Units DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und 2 Units MlyI. Die BSA-, sowie die Magnesiumkonzentration wurden in den Ansätzen variiert. Die Inkubationszeit betrug 18 h bei 41 °C.

Abb. 4.43, Seite 103

Die Ansätze enthielten die Oligonukleotide Pos2(3)D2-1rev, Pos3(3) und Pos4 in Konzentrationen von je 1 µM weiterhin 0,2 mM je dNTP, 0,4 U DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und variierende Mengen der Nuklease MlyI. Vor Zugabe der Enzyme wurden die Ansätze 3 min auf 94 °C erwärmt und über einen Zeitraum von 30 min abgekühlt. Die Inkubation erfolgte bei 41 °C für 18 h. Die Ansätze, die zusätzlich komplementäre PNA enthielten, zeigten ein abweichendes Laufverhalten im Gel.

Abb. 4.44, Seite 104

Die Ansätze mit einem Volumen von 50 µl enthielten die Primer Pos3(3) und Pos4 in Konzentrationen von je 1 µM. Weiterhin 0,2 mM je dNTP, 5 mM Magnesiumacetat, 1 µg/ml BSA, 8 U/ml DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und ggf. 10 U MlyI in 1x PCR-Puffer 2. Es wurden zudem 10⁵ bis 10⁹ Moleküle der PCR Vorlage Pos2(3)D2-1rev zugegeben. Vor Zugabe von Polymerase, MlyI und BSA wurden die Ansätze 3 min auf 70 °C erwärmt und auf 41 °C abgekühlt. Es wurde 18 h inkubiert, bevor die 30 Temperaturzyklen für die Amplifikation initiiert wurden (94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s). Bei der Primärdenaturierung (6 min bei 96 °C) wurde die Nuklease MlyI thermisch inaktiviert.

Abb. 4.45, Seite 104

Die Ansätze mit einem Volumen von 50 µl enthielten die Primer Pos3(3) und Pos4 in Konzentrationen von je 1 µM. Weiterhin 0,2 mM je dNTP, 5 mM Magnesiumacetat, 1 µg/ml BSA, 8 U/ml DeepVentR(exo⁻)-DNA-Polymerase und 10 U MlyI in 1x PCR-Puffer 2. Es wurden zudem 10⁵ PNA/DNA-Hybride aus dem Oligonukleotid Pos2(3)D2-1rev und PNA zu den Testansätzen gegeben. Um einen Hintergrund bestehend aus nicht hybridisierter DNA zu simulieren, wurden 10⁵ bis 10⁷ Moleküle der DNA-Bibliothek Pos2(3) zugegeben. Für jeden Ansatz, der PNA enthielt, wurde ein Kontrollansatz ohne PNA durchgeführt. Vor Zugabe von Polymerase, MlyI und BSA wurden die Ansätze 3 min auf 70 °C erwärmt und auf 41 °C abgekühlt. Es wurde 18 h inkubiert, bevor die 30 Temperaturzyklen für die Amplifikation gestartet wurden

(94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s). Bei der Primärdenaturierung (6 min bei 96 °C) wurde die Nuklease MlyI thermisch inaktiviert.

Abb. 4.49, Seite 108

Die Reaktion erfolgte in 250 mM MES/Triethylamin-Puffer (pH 7,5). Die Ansätze mit einem Volumen von 9 µl enthielten jeweils 10 pmol der Oligonukleotide ApPos2(5) (3'-Phos.) und BPos2(5) bzw. APos2(5) und pBPos2(5) (5'-Phos.), sowie 10 pmol PNA oder alternativ 10 pmol des Oligonukleotides D2-1 als Vorlage. Die Ansätze enthielten entweder (-) kein Mg²⁺ oder (+) 20 mM MgCl₂. Alle Ansätze wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf 4 °C abgekühlt. Die Ligation wurde durch Zugabe von 1 µl 10 M Cyanogenbromid in Acetonitril gestartet. Nach 4 min wurden die Ansätze in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden in 10 µl H₂O aufgenommen, in einer PAGE über ein 15%iges Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert. Bei Ansätzen mit PNA waren aufgrund der unvollständigen Denaturierung Doppelbanden im Gel vorhanden.

Abb. 4.50, Seite 108

Die Reaktion erfolgte in 250 mM MES/Triethylamin-Puffer (pH 6). Die Ansätze mit einem Volumen von 9 µl enthielten jeweils 10 pmol der Oligonukleotide ApPos2(5) (3'-Phos.) und BPos2(5) bzw. APos2(5) und pBPos2(5) (5'-Phos.), sowie 10 pmol PNA oder alternativ 10 pmol des Oligonukleotides D2-1 als Vorlage, sowie 20 mM MgCl₂. Alle Ansätze wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf 4 °C abgekühlt. Die Ligation wurde durch Zugabe von 1 µl 10 M Cyanogenbromid in Acetonitril gestartet. Nach 4 min wurden die Ansätze in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden in 10 µl H₂O aufgenommen, in einer PAGE über ein 15%iges Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert.

Abb. 4.51, Seite 110

Die Ligationsansätze enthielten die Oligonukleotide ApPos2(5) und BPos2(6) in Konzentrationen von jeweils 1 µM und 10⁷ PNA-Moleküle in 4x SSC-Puffer. Die Ansätze wurden 4 min auf 94 °C erwärmt und langsam abgekühlt. Nach Überführung der Reaktionslösung in Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße wurden diese 15 h bei 4 °C inkubiert, um die Hybride zu immobilisieren. Die Lösung wurde abgesaugt und die Gefäße 15 min mit Waschpuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min gespült. Es wurde 45 µl 250 mM MES/Triethylamin-Puffer (pH 7,5) mit 20 mM MgCl₂ in die Gefäße gegeben und auf 4 °C gekühlt. Nach Zugabe von 5 µl 10 M CNBr in Acetonitril wurde 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Gefäße ein mal mit 100 µl

CNBr-Blockpuffer gewaschen. Danach wurden die Gefäße mit 100 µl CNBr-Blockpuffer 2 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Puffers wurden 50 µl PCR-Reaktionsmischung mit den Primern Pos3(5) und Pos4(6) in die Gefäße gegeben und die Ansätze folgenden Temperaturzyklen unterzogen. (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 45 Zyklen).

Abb. 4.52, Seite 112

Alle Ansätze hatten ein Volumen von 20 µl und enthielten je 1 µM der Oligonukleotide APos2(5)D2-1rev und pBPos2(5)D2-1rev, 1 µM des Oligonukleotides D2-1 bzw. PNA als Ligationsvorlage, 40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 500 µM ATP, 10 mM DTT und 250 U/ml T4 DNA Ligase. Alle Komponenten mit Ausnahme der Enzyme wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Ligase gestartet und 2 h bei RT inkubiert.

Abb. 4.53, Seite 113

Alle Ansätze hatten ein Volumen von 20 µl und enthielten je 1 µM der Oligonukleotide APos2(5)D2-1rev und pBPos2(5)D2-1rev, 1 µM des Oligonukleotides D2-1 bzw. PNA als Ligationsvorlage, 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM Magnesiumacetat, 25 mM Kaliumacetat, 1 mM NAD, 10 mM DTT, 0.1 % Triton X-100 und 2000 U/ml Taq DNA Ligase. Alle Komponenten mit Ausnahme der Enzyme wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Ligase gestartet und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einer denaturierenden PAGE über ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert.

Abb. 4.54, Seite 114

Die Ansätze mit einem Volumen von 20 µl enthielten 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂, 100 µM ATP, 10 µg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase und je 1 µM der Oligonukleotide APos2(5)D2-1rev und pBPos2(5)D2-1rev, weiterhin 1 µM des Oligonukleotides D2-1 bzw. PNA als Ligationsvorlage. Alle Reagenzien außer BSA und T4 RNA Ligase wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von BSA und Ligase gestartet und 15 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einer denaturierenden PAGE über ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid detektiert.

Abb. 4.55, Seite 115

Die Hybridisierungsansätze mit Volumina von 10 µl enthielten die Oligonukleotide APos2(5)D2-1rev und pBPos2(5)D2-1rev in Konzentrationen von jeweils 1 µM und $2,3 \times 10^7$ PNA-Moleküle in 50 mM HEPES-NaOH (pH 8),

10 mM MgCl₂, 100 μM ATP. Die Ansätze wurden 4 min auf 94 °C erwärmt und langsam abgekühlt. Nach Zugabe von 10 μg/ml BSA und T4 RNA Ligase bis zu einer Endkonzentration von 330 U/ml erfolgt 3 h Inkubation bei RT. Anschließend wurden die Reaktionsmischungen in Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße überführt und 15 h bei 4 °C inkubiert, um die PNA/DNA-Hybride über die Biotingruppe an der PNA zu immobilisieren. Die Lösung wurde abgesaugt und die Gefäße 15 min mit Waschpuffer 2 bei einer Flussrate von 5 ml/min gespült. Es wurden 50 μl PCR-Reaktionsansätze mit Standard PCR-Puffer und den Primern Pos3(5) und Pos4(5) in die Gefäße gegeben und die Ansätze folgenden Temperaturzyklen unterzogen: 96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen.

Abb. 4.56, Seite 115

Die Hybridisierungsansätze mit Volumina von 10 μl enthielten die Oligonukleotide APos2(5)D2-1rev und pBPos2(5)D2-1rev in Konzentrationen von jeweils 1 μM und $2,3 \times 10^7$ PNA-Moleküle in 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂. Die Ansätze wurden 4 min auf 94 °C erwärmt und langsam abgekühlt. Nach Überführung der Hybridisierungslösung in Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße wurden diese 15 h bei RT inkubiert, um die Hybride zu immobilisieren. Die Lösung wurde abgesaugt und die Gefäße 15 min mit Waschpuffer 2 bei einer Flussrate von 5 ml/min gespült. Es wurden 20 μl Ligations-Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 10 μg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase. Nach 3 h Inkubation bei RT wurde die Lösung entfernt und 50 μl PCR-Reaktionslösung mit Standard PCR-Puffer und den Primern Pos3(5) und Pos4(7) in die Gefäße gegeben und die Ansätze folgenden Temperaturzyklen unterzogen. (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen).

Abb. 4.57, Seite 116

Die Hybridisierungsansätze mit Volumina von 10 μl enthielten die Oligonukleotide APos2(5) und pBPos2(7) in Konzentrationen von jeweils 1 μM und $2,3 \times 10^7$ PNA-Moleküle in 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂. Die Ansätze wurden 4 min auf 94 °C erwärmt und langsam abgekühlt. Nach Überführung der Reaktionslösung in Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße wurden diese 15 h bei RT inkubiert, um die Hybride zu immobilisieren. Die Lösung wurde abgesaugt und die Gefäße 15 min mit Waschpuffer 2 bei einer Flussrate von 5 ml/min gespült. Es wurden 20 μl Ligations-Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 10 μg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase. Nach 4 h Inkubation bei RT wurde die Lösung entfernt und 50 μl PCR-Reaktionslösung mit Standard PCR-Puffer und den Primern Pos3(5) und

Pos4(7) in die Gefäße gegeben und die Ansätze folgenden Temperaturzyklen unterzogen. (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 35 Zyklen).

Abb. 4.61, Seite 119

Die Ansätze mit einem Volumen von 30 µl enthielten 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂, 100 µM ATP, 10 µg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase, je 2 µM der Oligonukleotide und 2 µM der PNA als Ligationsvorlage. Es wurden jeweils drei Ansätze für 4mer, 5mer und 6mer Oligonukleotide durchgeführt. Ein Ansatz enthielt dabei ssDNA, PNA-Vorlage und Ligase. Die anderen zwei Ansätze dienten als Kontrolle und enthielten entweder keine Ligase oder keine PNA. Weiterhin wurden Oligonukleotide der Länge 16 nt, 15 nt und 18 nt als Referenz mit aufgetrennt. Alle Reagenzien außer BSA und T4 RNA Ligase wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von BSA und Ligase gestartet und 15 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze einer Gelfiltration (Sephadex G-25) unterzogen und in einer denaturierenden PAGE über ein 20%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe einer Silberfärbung detektiert.

Abb. 4.64, Seite 121

Links: Die Ligationen wurden in Ansätzen mit einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Diese enthielten 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MgCl₂, 100 µM ATP, 10 µg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase, die Oligonukleotide 4merLig5', 4merLig3' und die PNA in Konzentrationen von je 10 nM, weiterhin randomisierte und 5'-phosphorylierte ssDNA-Tetramere in einer Konzentration von 1 µM. Alle Komponenten außer BSA und T4 RNA Ligase wurden 2 min auf 94 °C erwärmt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von BSA und Ligase gestartet und 15 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße überführt und 7 h bei RT inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden zwei mal mit 150 µl Waschpuffer gewaschen und die immobilisierte DNA durch eine PCR mit Standard PCR-Puffer und den Primern 4merLig5' und 4merLig3'rev amplifiziert (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 38 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen).

Abb. 4.65, Seite 123

Die Ligationen wurden in Ansätzen mit einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Diese enthielten 50 mM HEPES-NaOH (pH 8), 10 mM MnCl₂, 100 µM ATP, 10 µg/ml BSA, 330 U/ml T4 RNA Ligase, die Oligonukleotide 4merLig5', 4merLig3' in Konzentrationen von je 100 nM und 80 nM PNA. Es wurden weiterhin randomisierte und 5'-phosphorylierte ssDNA-Dimere bis

zu einer Endkonzentration von 40 μM zugegeben. Alle Komponenten außer BSA und T4 RNA Ligase wurden 2 min auf 70 °C erwärmt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von BSA und Ligase gestartet und 15 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ligationsprodukte amplifiziert, indem 1 μl der Ligationsreaktionen in 50 μl PCR-Reaktionsmischungen gegeben wurden (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 30 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen).

Abb. 4.67, Seite 125

Die Ligationen wurden in 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,9) durchgeführt. Die Ansätze enthielten weiterhin 20 mM DTT, 10 mM MnCl_2 100 bzw. 20 μM ATP, 2 mM Spermin, 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA, die Oligonukleotide 2x4merLig5' und 2x4merLig3' in Konzentrationen von je 80 nM, 100 nM PNA, 4 μM randomisierte ssDNA-Tetramere und 170 U/ml T4 RNA Ligase. Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme von BSA und der Ligase wurden 2 min bei 70 °C inkubiert und auf RT abgekühlt. Die Ligation wurde durch die Zugabe von BSA und T4 RNA Ligase gestartet und die Reaktionsansätze 3 d bei RT inkubiert. Die Amplifikation der Ligationsprodukte erfolgte in einer PCR mit einem Volumen von 50 μl nach Zugabe von 1 μl der Ligationsreaktionslösung mit den Primern 2x4merLig5' und 2x4merLig3' rev in Standard PCR-Puffer (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 30 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen).

Abb. 4.69, Seite 128

Die Ligationsreaktionen wurden in 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,9) durchgeführt. Die Ansätze enthielten weiterhin 20 mM DTT, 2,5 mM MnCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 2 mM Spermin, 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA, das Oligonukleotid APos2(5)(-1)D2-Irev in einer Konzentration von 20, 40 oder 60 nM und 31 μM randomisierte ssDNA-Dimere (5'-phosphoryliert), 100 nM PNA, 30 mM Phosphokreatin, 10 μM ATP, 330 U/ml T4 RNA Ligase, 170 U/ml Myokinase und 170 U/ml Kreatinkinase. Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der Enzyme und des BSA wurden 2 min bei 70 °C inkubiert und auf RT abgekühlt. Die Ligation wurde durch die Zugabe von BSA, Myokinase, Kreatinkinase und T4 RNA Ligase gestartet und die Reaktionsansätze 5 d bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Oligonukleotides 2x4merLig3' bis zu einer Endkonzentration von 20, 40 bzw. 60 nM und weiterer 15 h Inkubation bei RT, erfolgte die Amplifikation der Ligationsprodukte in einer PCR in Standard PCR-Puffer mit einem Volumen von 50 μl und den Primern APos2(5)(-1)D2-Irev und 2x4merLig3' rev durch Zugabe von 1 μl der jeweiligen Ligationsreaktion. (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 30 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 30 Zyklen).

Abb. 4.71, Seite 130

Die Ligationsreaktionen wurden in 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,9) durchgeführt. Die Ansätze enthielten weiterhin 20 mM DTT, 10 mM MnCl₂, 100 µM ATP, 2 mM Spermin, 10 µg/ml BSA, das Oligonukleotid APos2(5)(-3)D2-1rev in einer Konzentration von 80 nM und 69 µM randomisierte 5'-phosphorylierte ssDNA-Trimere oder 40 µM randomisierte 5'-phosphorylierte ssDNA-Tetramere, gegebenenfalls 100 nM PNA und 170 U/ml T4 RNA Ligase. Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der T4 RNA Ligase und des BSA wurden 2 min bei 70 °C inkubiert und auf RT abgekühlt. Die Ligation wurde durch die Zugabe von BSA und T4 RNA Ligase gestartet und die Reaktionsansätze RT inkubiert. 6 h, 1 d, 2 d und 5 d nach dem Reaktionsstart wurden PCR mit je 1 µl der Ligationsreaktionen durchgeführt. Die PCR mit einem Volumen von 50 µl wurden in Standard PCR-Puffer durchgeführt und enthielten die Primer APos2(5)(-3)D2-1rev und 4merLig3'rev. (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 2 min; 10 °C, 5 min; 15 °C, 5 min; 20 °C, 5 min; 50 °C, 1 min; 10 Zyklen; 96 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 30 s; 40 Zyklen).

Abb. 4.75, Seite 133

Die DNA-Synthese an der PNA wurde in 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,9) durchgeführt. Die Ansätze enthielten weiterhin 20 mM DTT, 10 mM MnCl₂, 100 µM ATP, 2 mM Spermin, 10 µg/ml BSA, das Oligonukleotid 3merA (5'-GGT-3') in einer Konzentration von 1 µM und 69 µM randomisierte 5'-phosphorylierte ssDNA-Trimere, gegebenenfalls 100 nM PNA und 170 U/ml T4 RNA Ligase. Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der T4 RNA Ligase und des BSA wurden 2 min bei 70 °C inkubiert und auf RT abgekühlt. Die Ligation wurde durch die Zugabe von BSA und T4 RNA Ligase gestartet und die Reaktionsansätze 5 d bei RT inkubiert. Nach der Zugabe des Oligonukleotides pPos(HindIII) bis zu einer Endkonzentration von 1 µM wurden die Ansätze weitere 15 h inkubiert. 1 µl der Ligationsreaktionen wurde in eine PCR mit einem Volumen von 50 µl in Standard PCR-Puffer gegeben, die die Primer Pos(HindIII)fw und Pos(HindIII)rev enthielt. Nach 15 h Inkubation der PCR wurden zur Amplifikation 30 Temperaturzyklen durchlaufen (96 °C, 6 min Primärdenaturierung; 96 °C, 1 min; 42 °C, 1 min; 72 °C, 30 s).

Gefahrstoffe/Sicherheitsdaten

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheits-Ratschlägen nach §6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Verbindung	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
ABTS	Xi	36/37/38	26-36
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45 -
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
BCIP	-	-	22-24/25
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Cyanogenbromid	T ⁺ , N	26/27/28-34-50	9-15-26-28.1-36/37/39-45-61
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	-	-	24/25 -
Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Dithiothreitol	Xi	36/37/38	36/37/39-22
EDC	Xi	37/38-41	26-36/37/39
EDTA	Xn	22	-
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Gentamicin Sulfat	Xn	42/43	22-45-36/37/39
Glutardialdehyd, 25 %	T, N	22-23-34-42/43-50	26-36/37/39-45-61
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Kanamycin Sulfat	T	61	26-36/37-39-45
Methanol	F,T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45 -
NaOH	C	35	26-37/39-45
NBT	Xn	20/21-33	22-45
Phenol (Tris-gesättigt)	T	24/25-34	28.6-45
Salzsäure, konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	Xn	22-36/38	22-24/25
TEMED	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Tris	Xi	36/38	-
Wasserstoffperoxid 30 %	C	34	3-28-36/39-45

Tabelle 1 R- und S-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe

Entsorgung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entsprechend ihrer R- und S-Sätze gehandhabt und nach der Verordnung für gefährliche Stoffe (Gefahrgutverordnung) entsorgt. Organische halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel wurden getrennt in gekennzeichnete Behälter überführt. Kontaminierte Betriebsmittel wurden in dafür vorgesehenen Behältern gesammelt. Ethidiumbromid-Abfälle wurden in gesondert gekennzeichnete Behälter entsorgt. S1 kontaminierter Abfall wurde vor der Entsorgung in einem Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 Minuten bei 120 °C hitzesterilisiert.

Danksagung

Abschließend möchte ich meinen Dank an alle Personen richten, die mir helfend zur Seite standen und ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen voran mein Doktorvater Herr Prof. Dr. Reinhard Bredehorst, dem ich die Möglichkeit verdanke, dieses interessante und vielversprechende Thema zu bearbeiten und weiterzuführen. Durch seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Anteilnahme, seinen Einsatz und vor allem durch die Motivation, die er mir zukommen ließ, wurde die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht. Auch möchte ich die sportlichen Herausforderungen hier nicht unerwähnt lassen und mich auch dafür herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Uli Hahn gebührt mein Dank für die Unterstützung der Arbeit, die nicht unerheblich zum Erhalt der vorliegenden Ergebnisse beigetragen hat und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Dr. C. Betzel danke ich für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Ebenfalls richte ich meinen Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Bredehorst, insbesondere an Dr. Jan Münster für die stets sehr fruchtbaren Diskussionen und für die sowohl mentale als auch fachliche Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit und an Dr. Edzard Spillner für seine Ideen und die kritische Durchsicht der Arbeit, ebenso an die Mitarbeiter der PLS-Design GmbH, hier insbesondere an Dr. Thomas Grunwald, der durch sein Interesse und durch innovative Ideen die Arbeit maßgeblich vorangetrieben hat. Für die Bereitstellung der thermostabilen Dihydrofolatreduktase und dem dazugehörigen know-how danke ich ebenfalls Dr. Lars Redecke.

An dieser Stelle ebenfalls ein Dankeschön an alle Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Hahn, vor allem an Marcel Krepstakies, meinem Komilitonen und langjährigen Freund für die Unterstützung und Durchsicht der Arbeit, an Elena Hensel für die ständige Bereitschaft, mir bei Sequenzierungen und Bestellungen zur Seite zu stehen, an Dr. Patrick Ziegel Müller für Ratschläge, Diskussionen und die Korrektur der Arbeit, an Arne Werner für die Diskussionsbereitschaft und die Durchsicht der Arbeit und an Rico Czaja für die Hilfe bei datenverarbeitungs-technischen Problemen.

Anhang

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Dr. h.c.mult. Wolfgang Voelter für die Hilfe bei ausgefallenen Synthesen und der RiNA GmbH und ihren Mitarbeitern für das entgegengebrachte Vertrauen und die Förderung der Arbeit.

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine anderen, als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mark Matzas

Hamburg, 12.Dezember 2005

